
ADAM10 und -17 als Regulatoren der CD137-Funktion

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Jana Seidel

Kiel, 2021

Erste Gutachterin: Prof. Dr. Karina Reiß

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roeder

Tag der mündlichen Prüfung: 12.08.2021

Zum Druck genehmigt: 12.08.2021

Gez. Prof. Dr. Frank Kempken, Dekan

Meinen Großeltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	- 1 -
1.1 Proteolyse.....	- 1 -
1.2 Disintegrin-ähnliche Metalloproteasen.....	- 1 -
1.2.1 Struktur und Regulation von ADAM10 und ADAM17	- 2 -
1.2.2 Funktion und pathophysiologische Bedeutung von ADAM10 und ADAM17	- 5 -
1.3 TNF- Rezeptorfamilie.....	- 7 -
1.3.1 CD137 und sein Ligand	- 9 -
1.3.2 Regulation und Funktion des CD137-/CD137-Liganden-Systems	- 12 -
1.3.3 CD137 und seine Rolle in Erkrankungen	- 13 -
2 Zielsetzung	- 14 -
3 Material und Methoden	- 15 -
3.1 Materialien	- 15 -
3.2 Chemikalien.....	- 16 -
3.3 Kits	- 18 -
3.4 Geräte.....	- 18 -
3.5 Antikörper	- 19 -
3.5.1 Primäre Antikörper.....	- 19 -
3.5.2 Sekundäre Antikörper	- 20 -
3.6 Plasmide	- 20 -
3.7 Software	- 20 -
3.8 Zelllinien	- 21 -
3.9 Zellbiologische Methoden	- 22 -
3.9.1 Kultivierung von Zellen.....	- 22 -
3.9.2 Zellzahlbestimmung	- 23 -
3.9.3 Kryokonservierung	- 23 -
3.9.4 Transiente Transfektion	- 23 -
3.9.5 Inhibition und Stimulation in Zellkulturexperimenten.....	- 24 -
3.9.6 Lymphozyten-Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation	- 24 -
3.9.7 Zellseparation mittels Magnet-aktiviertem Zellsorter (MACS)	- 25 -
3.9.8 Oberflächenfärbung und Durchflusszytometrie.....	- 26 -
3.9.9 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)	- 26 -
3.9.10 ATP-basierter Proliferationsassay	- 27 -

3.10	Proteinbiochemische Methoden.....	- 27 -
3.10.1	Proteinextraktion aus Zellen	- 27 -
3.10.2	Quantifizierung des Proteingehaltes.....	- 28 -
3.10.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	- 28 -
3.10.4	<i>Western Blot</i>	- 29 -
3.10.5	Immunologische Detektion	- 29 -
3.10.6	<i>Strippen</i> der PVDF-Membran	- 30 -
3.10.7	<i>Simple Western</i>	- 30 -
3.11	Mikrobiologische Methoden	- 31 -
3.11.1	Kultivierung von Bakterien	- 31 -
3.11.2	Kryokonservierung	- 31 -
3.11.3	Transformation von Bakterien	- 31 -
3.12	Molekularbiologische Methoden	- 32 -
3.12.1	Plasmidpräparation	- 32 -
3.12.2	Quantifizierung von DNA und mRNA	- 32 -
3.12.3	Isolation von mRNA	- 32 -
3.12.4	Reverse Transkription.....	- 32 -
3.12.5	Oligonukleotide	- 33 -
3.12.6	Semi-quantitative <i>Real-Time</i> PCR.....	- 33 -
3.12.7	Agarose-Gelelektrophorese	- 34 -
3.12.8	<i>Real-Time</i> PCR.....	- 34 -
3.13	Statistik.....	- 35 -
4	Ergebnisse	- 37 -
4.1	Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf die Freisetzung von CD137.....	- 37 -
4.1.1	Metalloprotease-abhängige Freisetzung von CD137 in HT29.....	- 38 -
4.1.2	ADAM10 und ADAM17 setzen CD137 in HEK293T-Zellen frei	- 40 -
4.2	Untersuchung von CD137 in primären humanen T-Zellen.....	- 43 -
4.2.1	Analyse verschiedener Stimulanzien zur Expression von CD137 auf T-Zellen	- 44 -
4.2.2	ADAM-Inhibitoren führen zur Reduktion von sCD137 im Überstand von T-Zellen ..	- 47 -
4.2.3	Zugabe von ADAM-Inhibitoren führt zur Akkumulation von CD137 auf der Oberfläche	- 48 -
4.3	Physiologische Relevanz des CD137-Sheddings	- 50 -
4.3.1	Funktionelle Analyse des CD137/CD137-Ligand-Systems	- 51 -
4.3.2	Gesheddetes sCD137 beeinflusst Proliferation von T-Zellen	- 54 -
4.4	Nachweis von sCD137 in Seren von autoimmunerkrankten Patienten	- 57 -
5	Diskussion	- 60 -

5.1	ADAM10 als Hauptsheddase von CD137.....	- 60 -
5.2	Potentielle Bedeutung des Sheddings für die CD137/CD137-Liganden-Interaktion	- 64 -
5.3	Kein signifikanter Unterschied von sCD137 in Seren von autoimmunerkrankten Patienten	- 69 -
5.4	Ausblick.....	- 72 -
6	Zusammenfassung	- 73 -
7	Summary.....	- 75 -
8	Literaturverzeichnis	- 77 -
9	Abbildungsverzeichnis	- 96 -
10	Tabellenverzeichnis.....	- 97 -
11	Publikationen	- 98 -
12	Danksagung.....	- 99 -
13	Erklärung.....	- 100 -
14	Lebenslauf.....	- 100 -

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>
AESF	<i>4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride</i>
AK	Antikörper
ANO6H	Hyperaktives Anoctamin-6
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> /Varianzanalyse
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> /Rinderserumalbumin
CANDIS	<i>Conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence</i>
CD137L	CD137-Ligand
dKO	<i>Double Knock-Out</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> /Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycolbistetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<i>Et al.</i>	Und andere
FCS	<i>Fetal calf serum</i> /Fetales Kälberserum
GI	GI254023X
GW	GW280264X
HEK	<i>Human embryonic kidney cells</i>
HCl	Salzsäure
HL-60	<i>Human promyelocytic leukemia cells</i>
HPRT1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HRP	<i>Streptavidin-horseradish peroxidase</i>
IL	Interleukin
IO	Ionomycin
KCl	Kaliumchlorid
LRS	Leukozytenrückhaltesystem

mAk	Monoklonaler Antikörper
mCD137	Membranständiges CD137
Mel	Melittin
MM	Marimastat
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	nukleärer Faktor κB
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> /Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Propidium Iodid
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>Rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RPMI	<i>Roswell park memorial institute medium</i>
sCD137	Lösliches CD137
SD	<i>Standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> / Standardfehler des Mittelwertes
TACE	<i>TNF alpha converting enzyme</i>
TAE	TRIS-Acetate-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFα	<i>Transforming growth factor alpha</i>
tGFP	Turbo Grün fluoreszierendes Protein
TMB	Tetramethylbenzin
TNFR	<i>tumor necrosis factor receptor</i>
Tregs	Regulatorische T-Zellen
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
üN	Über Nacht
WT	Wildtyp

1 EINLEITUNG

1.1 PROTEOLYSE

Die Proteolyse ist eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen und ein entscheidender Regulationsmechanismus für Zellen. Durch hydrolytische Spaltung, die durch proteolytisch aktive Proteine vermittelt wird, sogenannte Proteasen, werden Peptide und Proteine irreversibel geschnitten. Durch diesen Vorgang, der als ‚Shedding‘ bezeichnet wird, entstehen wiederum kleinere metabolisch aktive Proteine. Eine Untergruppe der Proteasen bilden die Sheddase. Sheddase sind membrangebunden und schneiden andere Transmembranproteine an ihrer Ektodomäne von der Membran und setzen sie so in den extrazellulären Raum frei. Es sind eine Vielzahl an Proteasen und Sheddase bekannt, welche eine beeindruckende Funktionsvielfalt aufweisen (Puente *et al.*, 2003; Rani *et al.*, 2012). Eine Gruppe der Sheddase, welcher eine wichtige Bedeutung für physiologische und pathologische Prozesse zukommt, sind die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen.

1.2 DISINTEGRIN-ÄHNLICHE METALLOPROTEASEN

Die Disintegrin-ähnlichen Metalloproteasen - kurz ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*)-besitzen eine Disintegrin- und eine Metalloprotease-Domäne und sind transmembrane Typ I-Glykoproteine. Sie gehören zur Gruppe der Metzinkine und sind somit zinkabhängige Metalloproteasen. Zu dieser Familie zählen auch Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Astacine, Serralysine und Adamalysine. All diesen Gruppen ist gemeinsam, dass sie einen konservierten Methionin-Rest und ein Zinkbindungsmotiv mit drei Histidin-Resten (HExxHxxGxxH) in ihrer proteolytisch aktiven Domäne besitzen. Die ADAMs werden zusammen mit den ADAMTS, *a disintegrin and metalloproteases with a thrombospondin motif*, und den SVMPs, *snake venom metalloproteases*, zu den Adamalysinen gezählt (Bode *et al.*, 1993; Huxley-Jones *et al.*, 2007; Abbildung 1).

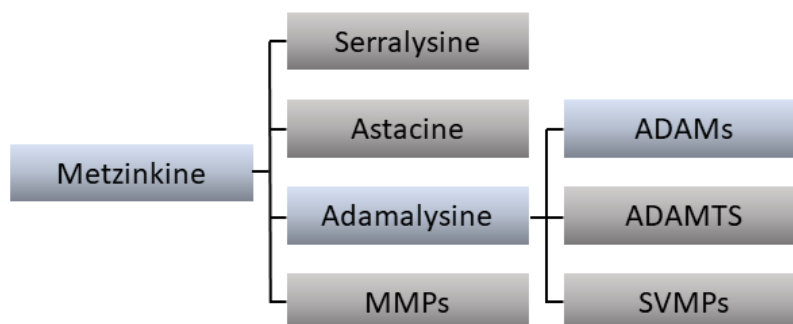


Abbildung 1: Klassifizierung der Zink-Metalloproteasen. Metzinkine sind zinkabhängige Metalloproteasen zu

denen die Serralysine, Astacine, Adamalysine und Matrix-Metalloproteasen (MMPs) gehören. Zu den Adamalysinen zählen die ADAMs (*a disintegrin and metalloproteases*), ADAMTSs (*a disintegrin and metalloproteases with a thrombospondin motif*) und die SVMPS (*snake venom metalloproteases*) (modifiziert nach Huxley-Jones *et al.*, 2007).

ADAMs konnten in einer Vielzahl an Spezies, u.a. dem Menschen, der Maus und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, nachgewiesen werden. Bislang wurden 21 Gene für die ADAMs im Menschen beschrieben. Lediglich 13 der 21 ADAMs gelten jedoch als proteolytisch aktiv, namentlich ADAM1, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33 (Edwards *et al.*, 2009). Die proteolytisch inaktiven ADAMs weisen zwar alle die Metalloprotease-Domäne auf, jedoch fehlt ihnen das Zinkbindemotiv. Sie sind durch ihre Disintegrin-Domäne für die Zell-Zell-Interaktion verantwortlich. Proteolytisch aktive ADAMs setzen hingegen andere Transmembranproteine durch sogenanntes Shedding frei. Die beiden am besten charakterisierten proteolytisch aktiven ADAMs sind ADAM10 und ADAM17 (Blobel, 2005; Saftig und Reiss, 2011).

1.2.1 STRUKTUR UND REGULATION VON ADAM10 UND ADAM17

Die ADAMs werden auf Grund ihrer Domänenstruktur in ‚typische‘ und ‚atypische‘ ADAMs unterteilt. Vom N-Terminus ausgehend setzt sich die Struktur der typischen ADAMs wie folgt zusammen: Pro-, Metalloprotease-, Disintegrin-, Cysteinreiche, EGF (*epidermal growth factor*)-ähnliche, Transmembran- und zytoplasmatische Domäne (Seals und Courtneidge, 2003). Durch ihre strukturelle Abweichung vom klassischen Aufbau zählen ADAM10 und -17 zu den ‚atypischen‘ ADAMs. Der N-Terminus beginnt bei beiden mit einer Prodomäne (Marcia L. Moss *et al.*, 2007). Darauf folgt die Metalloprotease-Domäne (Giebeler und Zigrino, 2016). Danach schließt sich bei ADAM10 eine Disintegrin- und eine Cysteinreiche Domäne an. In ADAM17 hingegen werden ein Teil der Disintegrin- und der gesamte Teil der Cysteinreichen Domäne als membranproximale Domäne bezeichnet (Lorenzen *et al.*, 2012). Das Aktivierungsmotiv, welches bei ADAM10 in der Cysteinreichen Domäne (Janes *et al.*, 2005) und bei ADAM17 in der membranproximalen Domäne zu finden ist, ist an der Regulation der proteolytischen Aktivität der Protease beteiligt. Durch die Interaktion des hier lokalisierten positiv geladenen RKxK-Motivs mit dem negativ geladenen Phosphatidylserin (PS) der Zellmembran kann die Shedding-Aktivität von ADAM17 reguliert werden (Sommer *et al.*, 2016). Auf die Cysteinreiche Domäne folgt bei ADAM10 die *Stalk*-Domäne. Sie beinhaltet ebenfalls ein positiv geladenes PS-bindendes Motiv, welches analog dem RKxK-Motiv in ADAM17 ist. Es interagiert ebenfalls mit PS in der Zellmembran (Bleibaum *et al.*, 2019). ADAM17 hingegen hat statt der *Stalk*-Domäne eine CANDIS-Domäne, *conserved ADAM-*

seventeen dynamic interaction sequence (Düsterhöft *et al.*, 2015). Schlussendlich endet die Struktur von ADAM10 und ADAM17 am C-Terminus jeweils mit der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 2).

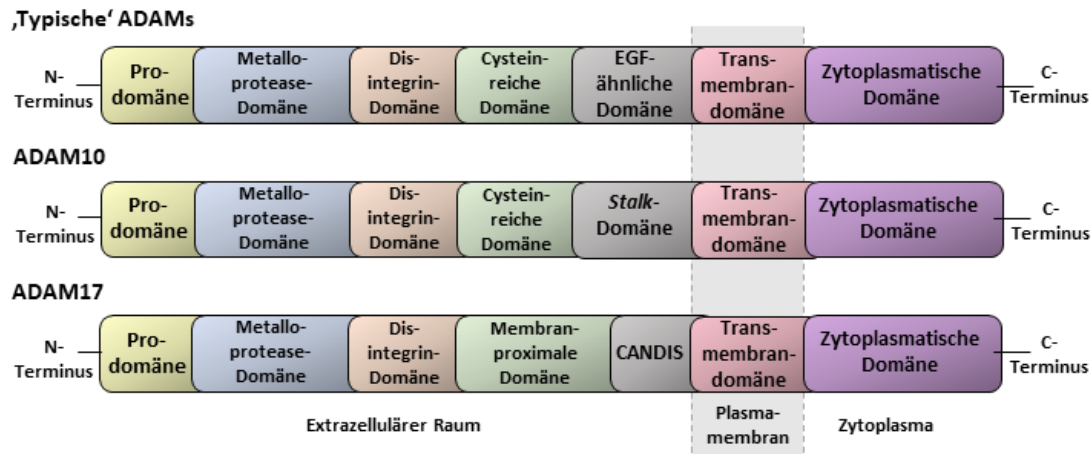


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur ,typischer‘ ADAMs und der ,atypischen‘ ADAM10 und -17. ,Typische‘ ADAMs, welche katalytisch aktiv sind, bestehen vom N-Terminus ausgehend aus einer Prodomäne, einer Metalloprotease-Domäne, einer Disintegrin-Domäne, einer Cysteinreichen Domäne, einer EGF-ähnlichen Domäne, einer Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne. Anstelle der EGF-ähnlichen Domäne besitzt ADAM10 eine *Stalk*-Domäne. Die Cysteinreiche Domäne und die EGF-ähnliche Domäne sind in ADAM17 ersetzt durch eine membranproximale Domäne und CANDIS (*conserved ADAM-seventeen dynamic interaction sequence*) (nach Moss und Lambert, 2002; Arribas und Esselens, 2009).

Die Hauptfunktion von ADAM10 und -17 liegt in ihrer proteolytischen Aktivität und der damit vermittelten Freisetzung der Ektodomäne ihrer Substrate. Bislang sind für beide Proteasen bereits über 40 bzw. 80 Substrate beschrieben (Dreymueller *et al.*, 2012). Dies können sowohl transmembrane Typ I- und II-Glykoproteine aber auch Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine sein. Die Sequenz ihrer Schnittstelle ist nicht übereinstimmend, jedoch werden alle Substrate stets im juxtamembranen Bereich geschnitten (Reiss und Saftig, 2009).

Beispielsweise werden Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren und Wachstumsfaktoren als Substrate von ADAM10 und -17 gespalten. Die Freisetzung ihrer Ektodomäne durch Shedding führt zur funktionellen Modifizierung des Substrats. Einige Substrate können spezifisch nur von einer Protease, andere hingegen von verschiedenen Proteasen prozessiert werden (Saftig und Reiss, 2011). ADAM10 und -17 haben zwar unterschiedliche Substratspektren, allerdings können durch kompensatorische Effekte zwischen beiden Proteasen auch Substrate durch die jeweils andere Protease abgespalten werden (Reddy *et al.*, 2000; Juanes *et al.*, 2005; Möller-Hackbarth *et al.*, 2013).

ADAM10 und -17 können auf eine Vielzahl von Arten reguliert werden. Faktoren wie Retinsäure und Zytokine beeinflussen beispielweise die Transkription (Tippmann *et al.*, 2009; Faber *et al.*, 2014). Durch hypoxische (sauerstoffarme) Bedingungen kann die Expression ebenfalls beeinflusst und modifiziert werden. Der Transport vom Golgi-Apparat bis hin zur Zelloberfläche wird bei ADAM10 durch Tetraspanine (Prox *et al.*, 2012; Seipold *et al.*, 2017) und bei ADAM17 durch iRhom1 und iRhom2 (Harris, 2002; Cavadas *et al.*, 2017) vermittelt.

Lange ging man davon aus, dass die Aktivierung der ADAMs über ihre zytoplasmatische Domäne geschieht. Dies konnte bereits widerlegt werden (Le Gall *et al.*, 2010; Maretzky *et al.*, 2015). Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die PS-Externalisierung in der Zellmembran ein entscheidender Faktor der ADAM-Aktivierung ist. In einer intakten Zellmembran kommen Phosphatidylethanolamine (PE) und Phosphatidylserin (PS) vorrangig auf der zytosolischen Seite und Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyeline auf der extrazellulären Seite vor (Kobayashi *et al.*, 2002; Van Meer und De Kroon, 2011). Scramblasen, welche in der Zellmembran sitzen, transportieren diese Lipide bidirektional entlang ihres Gradienten. Ein induzierter Kalziumeinstrom durch z.B. Ionomycin führt zur Aktivierung kalziumabhängiger Scramblasen. Eine davon ist Anoctamin-6 (ANO6) (Grubb *et al.*, 2013). ANO6 führt durch seine Scramblaseaktivität zur PS-Externalisierung. Die PS-bindenden Motive in der membranproximalen Domäne von ADAM17 und der *Stalk*-Domäne von ADAM10 können nun mit dem externalisierten PS interagieren und führen so zu einer Konformationsänderung der ADAMs in ihre aktive Sheddingposition (Sommer *et al.*, 2016; Bleibaum *et al.*, 2019; Veit *et al.*, 2019; Abbildung 3).

ADAM10 und -17 shedden ihre Substrate konstitutiv, aber auch physiologische und unphysiologische Stimuli und Inhibitoren spielen bei der Regulation der proteolytischen Aktivität eine bedeutende Rolle. Physiologische Stimuli können beispielsweise Zytokine oder Wachstumsfaktoren, wie EGF, sein. Aber auch durch unphysiologische Stimuli, wie z.B. den Phorbol-ester PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetat), den Kalzium-Ionophor Ionomycin oder Melittin, kann eine proteolytische Aktivität ausgelöst werden (Huovila *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2012). Ionomycin bewirkt einen Einstrom von Kalziumionen in die Zelle, wodurch wiederum ANO6 und somit ADAM10 und -17 aktiviert werden. Melittin, als Bestandteil von Bienengift, bewirkt ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration. Es aktiviert P2-Rezeptoren und eine Porenformation mittels Lipid-Protein-Interaktion, wodurch

die intrazelluläre Kalziumkonzentration steigt. Hierdurch werden ebenfalls ADAM10 und -17 aktiviert (Sommer *et al.*, 2012). PMA gilt ebenfalls als Aktivator von ADAM17. Man geht davon aus, dass auch hier eine Scramblase involviert ist, welche ist allerdings bislang unklar.

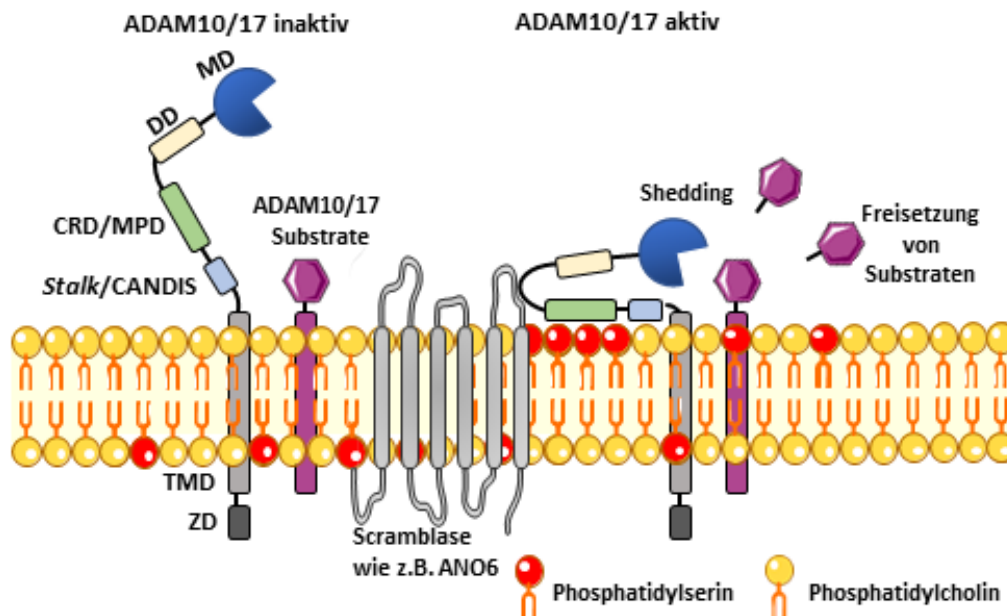


Abbildung 3: Aktivierung von ADAM10/17 vermitteltem Shedding. In ihrer inaktiven Konformation können ADAM10 und -17 ihre Substrate nicht von der Membran abschneiden. Durch Stimulanzen wie z.B. Ionomycin wird Phosphatidylserin (PS) durch eine Scramblase, wie ANO6, auf die extrazelluläre Seite der Membran gebracht. Durch diese PS-Externalisierung kann die CRD oder MPD von ADAM10/17 mit dem PS interagieren und binden. ADAM10/17 werden so in ihre aktive Konformation gebracht und können ihre Substrate schneiden.

1.2.2 FUNKTION UND PATHOPHYSIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON ADAM10 UND ADAM17

Die ADAMs besitzen zwei Hauptfunktionen. Zum einen vermitteln sie die Zelladhäsion durch das Interagieren mit Integrinen z.B. ADAM1 und -2, zum anderen setzen z.B. ADAM10 oder -17 Substrate durch ihre proteolytische Aktivität frei. Wie bereits erwähnt, zählen eine Vielzahl an Zytokinen, Adhäsionsmolekülen und Wachstumsfaktoren zu ihren Substraten. Einige ausgewählte Substrate sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Ausgewählte Substrate von ADAM10 und ADAM17

Substrat	Involvierte ADAMs	Funktion	Referenzen
Notch	ADAM10	Embryonale Entwicklung	Brou <i>et al.</i> , 2000
TGF α	ADAM17	Proliferation, Migration, Differenzierung	Mead und Fausto, 1989; Arribas <i>et al.</i> , 1996; Le Gall <i>et al.</i> , 2009
TNF α	ADAM17	Inflammation	Bell <i>et al.</i> , 2007; Rath und Aggarwal, 1999
TNFR1	ADAM17	Anti-Inflammation	Reddy <i>et al.</i> , 2000
E-Cadherin	ADAM10	Permeabilität	Maretzky <i>et al.</i> , 2005

E-Cadherin (epithelial), VE-Cadherin (vaskulär-endothelial) oder N-Cadherin (neuronal) sind nur einige der Adhäsionsmoleküle, welche primär durch ADAM10 freigesetzt werden. Sie spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion, der Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten und der Erhaltung der Zellpolarität (Maretzky *et al.*, 2005; Reiss *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2008). So führt beispielsweise das Shedding von VE-Cadherin zu einer erhöhten Permeabilität des Zellverbandes, die wiederum zu einer verstärkten Transmigration von T-Zellen (Schulz *et al.*, 2008).

Ebenfalls spielt ADAM10 eine entscheidende Rolle in der frühen Embryogenese, da es den Notch-Signalweg kontrolliert (Groot und Vooijs, 2012). ADAM10-defiziente Mäuse sterben bereits am Embryonaltag E9,5. Ihr Phänotyp ähnelt stark dem von Notch-defizienten Mäusen (Krebs *et al.*, 2000) und sie weisen eine gestörte Entwicklung des Herzens und des zentralen Nervensystems auf (Hartmann *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde eine erhöhte ADAM10-Expression und ein verstärkter Notch-Signalweg in Krebsstammzellen nachgewiesen. Krebsstammzellen dienen dem Tumorwachstum, der Metastasenbildung und der Chemoresistenz. Der Notch-Signalweg fördert hier die Angiogenese und das Überleben dieser Krebsstammzellen (Roca und Adams, 2007; Espinoza *et al.*, 2013; Giancotti, 2013).

ADAM17 wurde erstmals als TACE (*TNF alpha converting enzyme*) bekannt. Es setzt das aktive TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) durch Shedding der membrangebundenen Proform frei (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). TNF α ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches bei lokalen und systematischen Entzündungen Immunzellen zum Entzündungsherd lockt. Es wird oft mit Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn oder Psoriasis assoziiert (Ettehad *et al.*, 1994; Papadakis und Targan, 2000; Weissmann, 2006; McInnes und Schett, 2011).

ADAM17 gilt außerdem als Hauptsheddase der TNFR- (*tumor necrosis factor receptor*) Familie, zu der u.a. TNFR1 und -2 gehören. Die funktionelle Wirkung des TNFR-Sheddings ist vielfältig. Die Abspaltung der Ektodomäne führt z.B. zur Desensibilisierung der Zellen gegenüber TNF α , womit es zu einer Abschwächung inflammatorischer Antworten kommt (Heller *et al.*, 1990; Peschon *et al.*, 1998; Van Zee *et al.*, 1992).

Sowohl ADAM10 als auch ADAM17 tragen also durch proteolytische Freisetzung ihrer Substrate wie Notch, EGFR-Liganden oder TNFRs zur Modulierung entzündlicher Prozesse bei,

welche häufig mit Tumor- oder Autoimmunerkrankungen einhergehen (Crawford *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2020).

1.3 TNF- REZEPTORFAMILIE

Unser Immunsystem gilt als sehr komplex und funktioniert über eine Vielzahl an Zellen und Botenstoffen, die miteinander in Kontakt stehen. Diese Kommunikation geschieht über zahlreiche Zytokine, die über ihre Rezeptor-Ligand-Bindung an den Zellen miteinander interagieren. So werden u.a. Entzündungsreaktionen, Differenzierung und Proliferation der Zellen und die Apoptose reguliert bzw. gesteuert.

Der TNF/TNFR-Superfamilie kommt hierbei ein großer Stellenwert zu. Sie gehört mit zu den am besten charakterisierten Genfamilien (Ashkenazi und Dixit, 1998; Locksley *et al.*, 2001; Hehlhans und Pfeffer, 2005). Die Rezeptoren dieser Familie sind glykolisierte Typ I-Transmembranproteine. In den Aminosäuren ihrer extrazellulären Teile findet man ca. drei bis sechs Cysteinreiche Domänen, welche drei Disulfidbrücken enthalten. Diese werden durch sechs konservierte Cysteinreste gebildet, wodurch die Rezeptoren eine längliche Form erhalten (Mallett und Barclay, 1991; Armitage, 1994; Smith *et al.*, 1994; Lotz *et al.*, 1996).

Die meisten TNF-Rezeptor-Liganden hingegen sind Typ II-Transmembranproteine, deren N-Terminus intrazellulär liegt. Sowohl TNF-Rezeptoren als auch -Liganden können in membranständiger als auch löslicher Form vorkommen (Hehlhans und Pfeffer, 2005; Remouchamps *et al.*, 2011).

Aufgrund ihrer Signalmechanismen lassen sich TNF-Rezeptoren in zwei Gruppen einteilen. Zum einen gibt es Rezeptoren, welche Apoptose induzieren, aber keine eigene Enzymaktivität besitzen. Zu ihnen gehören z.B. Fas (CD95) und TRAIL (Tumornekrosefaktor-verwandter Apoptose-induzierender Ligand-Rezeptor). In ihrer jeweiligen Signaldomäne befindet sich eine konservierte Struktur, die Todesdomäne (*Death Domain*). Ihre Aktivierung führt über spezielle Adaptermoleküle zur Caspase-8-Rekrutierung. Die Caspase-8 initiiert über die Aktivierung der Caspasekaskade den programmierten Zelltod (Boldin *et al.*, 1996).

Die andere Gruppe beinhaltet Rezeptoren, welche keine Todesdomäne besitzen. Deren Aktivierung führt zur Rekrutierung von TNFR- assoziierten Faktoren (TRAFs). Es sind bislang 14 Mitglieder der TNFR-Superfamilie bekannt, welche mit TRAFs interagieren können. Hierzu zählen CD40 (Stamenkovic *et al.*, 1989), p75TNFR (Rothe *et al.*, 1994), CD30 (Gedrich *et al.*,

1996), CD27 (Akiba *et al.*, 1998), LT β R (Nakano *et al.*, 1996), RANK (Anderson *et al.*, 1997), CD137 (Garni-Wagner *et al.*, 1996), OX40 (Arch und Thompson, 1998), HVEM (Hsu *et al.*, 1997; Marsters *et al.*, 1997), GITR (Gurney *et al.*, 1999; Kwon *et al.*, 1999), BCMA (Hatzoglou *et al.*, 2000), BAFF-R (Thompson *et al.*, 2001), TACI (Xia *et al.*, 2000) und TROY (Kojima *et al.*, 2000). Tabelle 2 zeigt die bislang 14 Mitglieder der TNFR-Superfamilie, welche mit TRAFs interagieren, ihre Liganden und ihre Funktion.

Tabelle 2: Funktion und Liganden TRAF-bindender Mitglieder der TNFR-Superfamilie

Rezeptor	Shedding bekannt durch	Ligand	Funktion	Referenzen
CD40	ADAM17	CD154	Adhäsion, Proliferation und Induktion des Isotypswitch	Contin <i>et al.</i> , 2003; Kuhne <i>et al.</i> , 1997; Stamenkovic <i>et al.</i> , 1989
p75TNFR	ADAM17	NGF, BDNF, NT-3, NT-4	Proliferation von NK-, B-, reifer T-Zellen, GM-CSF-Sekretion von T-Lymphozyten	Rothe <i>et al.</i> , 1994; Sahin <i>et al.</i> , 2004
CD30	ADAM17	CD30L (CD153)	Proliferation oder Apoptose peripherer T-Lymphozyten, Induziert Expression von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen	Gedrich <i>et al.</i> , 1996; Ansieau <i>et al.</i> , 1996; von Tresckow <i>et al.</i> , 2004
CD27	Metalloprotease	CD70, Siva	T-T-Zell- und T-B-Zell-Interaktion	Akiba <i>et al.</i> , 1998; Graveststein <i>et al.</i> , 1998; Pupovac und Sluyter, 2016
LT β R	Unbekannt	Lymphotoxin beta (TNF-C)	Entwicklung und Proliferation sekundären Lymphgewebes	Nakano <i>et al.</i> , 1996; Force <i>et al.</i> , 2000
RANK	ADAM17	RANKL	Aktivierung der DC-Funktion über BcL-X _L Osteoklastendifferenzierung	Anderson <i>et al.</i> , 1997; Darnay <i>et al.</i> , 1998; Galibert <i>et al.</i> , 1998
CD137	Unbekannt (vermutlich Metalloprotease)	CD137L	T-Zell-abhängige Immunantwort, Antitumoraktivität	Garni-Wagner <i>et al.</i> , 1996; Arch und Thompson, 1998; Jang <i>et al.</i> , 1998; Taraban <i>et al.</i> , 2002
OX40	Metalloprotease	OX40L	Kostimulation von T-Zellen, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen	Arch und Thompson, 1998; Kawamata <i>et al.</i> , 1998; Taraban <i>et al.</i> , 2002
HVEM	Unbekannt	HVEML	Lymphozytenaktivierung, Herpesvirus-Einschleusung während der Infektion	Hsu <i>et al.</i> , 1997; Marsters <i>et al.</i> , 1997

GITR	Unbekannt	GITRL	Inhibition T-Zell-Rezeptor-vermittelter Apoptose	Gurney <i>et al.</i> , 1999; Kwon <i>et al.</i> , 1999
BCMA	γ -Sekretase	APRIL, BAFF	Unbekannt	Hatzoglou <i>et al.</i> , 2000; Waldschmidt und Noelle, 2012; Laurent <i>et al.</i> , 2015
TROY	Unbekannt	NgR1	Rolle bei der der Embryonalentwicklung, induzierte Apoptose	Kojima <i>et al.</i> , 2000
TACI	ADAM10 ADAM17	APRIL, BAFF, CAML	Unterstützt die Th1-Antwort, negative Regulation der B-Zell-Antwort	Xia <i>et al.</i> , 2000; Waldschmidt & Noelle, 2012; Smulski <i>et al.</i> , 2017
BAFF-R	ADAM10 ADAM17	APRIL, BAFF	Überleben transitorischer B-Zellen, verstärkt die humorale Immunität	Thompson <i>et al.</i> , 2001; Waldschmidt und Noelle, 2012; Smulski <i>et al.</i> , 2017

BCMA bildet hier eine Ausnahme, da es als einziger Rezeptor zum Typ I-Transmembranprotein gehört. Über die Signaltransduktionsketten, welche bei Interaktion mit den TRAFs induziert werden, werden intrazelluläre Signalwege wie der des nukleären Faktor κ B (NF κ B) aktiviert, was schlussendlich z.B. die Proliferation der Zellen fördert (Locksley *et al.*, 2001).

Für einige Mitglieder der TNFR-Superfamilie und ihren Liganden ist eine bidirektionale Signalübertragung beschrieben. So kommt es bei Bindung des Rezeptor/Liganden-Paares nicht nur zur Signalübertragung durch den Rezeptor. Es kommt ebenfalls zur Signalübertragung in die Liganden exprimierende Zelle (Wiley *et al.*, 1996; Langstein *et al.*, 1999; Lens *et al.*, 1999).

Einige der Rezeptoren kommen auch in löslicher Form vor. Es ist bekannt, dass CD27, CD30, CD40 und OX40 durch Metalloproteasen von der Membran abgespalten werden (Gruss und Dower, 1995). Für CD95 und CD137 ging man bislang davon aus, dass sie durch alternatives *Splicing* gebildet werden (Goodwin *et al.*, 1993; Dev *et al.*, 1994; Cascino *et al.*, 1995; Setareh *et al.*, 1995; Michel *et al.*, 1998).

1.3.1 CD137 UND SEIN LIGAND

Das humane CD137 wurde erstmals 1993 als ILA (*induced by lymphocyte activation*) auf aktivierten T-Lymphozyten bei der Suche nach induzierbaren Rezeptoren nachgewiesen (Schwarz *et al.*, 1993). 1996 wurden das humane ILA und das vier Jahre zuvor entdeckte homologe murine 4-1BB (Kwon und Weissman, 1989) als CD137 zusammengefasst (Kishimoto *et al.*, 1997).

Das humane Gen für *CD137* ist auf Chromosom 1p36 lokalisiert. An dieser Stelle befinden sich ebenfalls die Gene weiterer Mitglieder der TNFR-Superfamilie, wie *OX40* oder *TNFR2*. Translokationen an dieser Stelle gehen oft mit verschiedenen hämatopoetischen Erkrankungen einher, Deletionen dieses Gens oft mit malignen Tumoren (Schwarz *et al.*, 1997).

CD137 ist ein Typ I-Transmembranprotein. Es besteht aus 255 Aminosäuren und weist eine 60 % ige Übereinstimmung zum murinem CD137 auf (Schwarz *et al.*, 1997). Das Protein besteht aus einem Signalpeptid, einer Cysteinreiche-extrazellulär Domäne, einer hydrophoben Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (Zhou *et al.*, 1995). Das errechnete Molekulargewicht für CD137 liegt bei 28 kDa, das tatsächliche Molekulargewicht liegt allerdings bei 35 kDa. Außerdem kann eine Bande bei ca. 55 kDa detektiert werden. Diese Unterschiede kommen vermutlich durch posttranslationale Modifikationen zustande (Schwarz *et al.*, 1993; Pollok *et al.*, 1993).

Bislang konnten in humanen aktivierten T-Lymphozyten drei mRNA-Isoformen von 4,4 kb, 4,0 kb und 1,8 kb für CD137 beschrieben werden. In Chondrozyten wurden zusätzlich drei weitere Isoformen von 3,2 kb, 1,5 kb und 1,2 kb gefunden (Schwarz *et al.*, 1995; Von Kempis *et al.*, 1997). Außerdem kommt CD137 nicht nur membranständig, sondern auch in löslicher Form vor. Hier ging man bislang davon aus, dass es sich um eine *Splicing*-Variante handelt (Michel *et al.*, 1998). Im Menschen sind bislang zwei, in der Maus eine *Splicing*-Variante bekannt (Kwon *et al.*, 1994; Setareh *et al.*, 1995). Die humane mRNA, welche für das Transmembranprotein kodiert, enthält sieben Exons. Bei der mRNA der *Splicing*-Variante 1 fehlt das Exon 5, bei der *Splicing*-Variante 2 fehlen Exon 5 und 6 (NCBI; Abbildung 4). Es gab lediglich für murines CD137 einen Hinweis, dass es sich bei der löslichen Form von CD137 auch um das Produkt proteolytischen Sheddings durch eine Metalloprotease handeln könnte (Taraban *et al.*, 2002).

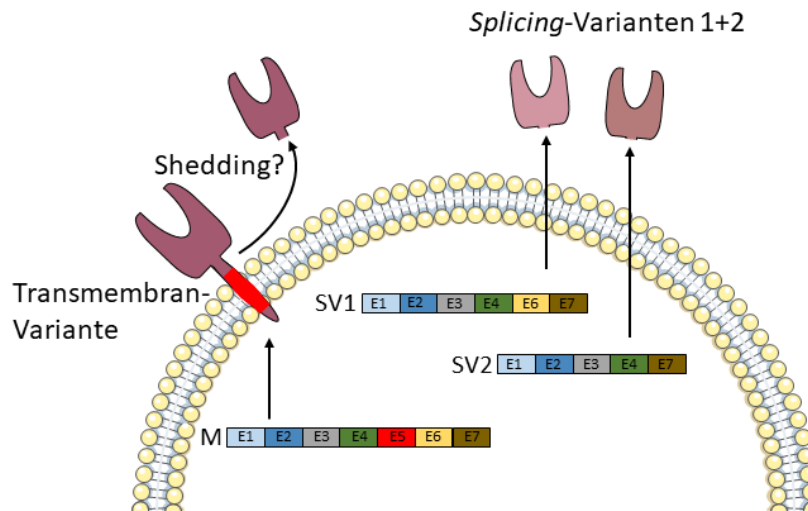


Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen CD137-Proteinsynthese. Drei humane mRNA-Varianten sind für CD137 bekannt. Die Transmembran-Variante (M) enthält sieben Exons (E1-7). Bei der *Splicing*-Variante 1 (SV1) fehlt Exon 5, bei der *Splicing*-Variante 2 (SV2) fehlen Exon 5 und 6. Sowohl SV1 und SV2 können als lösliche Varianten sekretiert werden.

Der humane Ligand für CD137 ist das Typ II-Transmembranprotein CD137-Ligand, auch 4-1BBL genannt. Das Gen für den Liganden liegt auf Chromosom 19p13.3. Der CD137-Ligand umfasst 254 Aminosäuren und sein errechnetes Molekulargewicht liegt bei 26 kDa. Allerdings liegt das tatsächliche Molekulargewicht bei ca. 50 kDa, was daraufhin deutet, dass es auch hier zu posttranslationalen Modifikationen kommt. Die Expression des Liganden konnte u.a. in Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), aktivierten T-Lymphozyten und der monozytären Zelllinie THP1 gezeigt werden (Goodwin *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994).

CD137 wird nach Aktivierung mit z.B. anti-CD3, Phytohämagglutinin (PHA) oder PMA auf T-Lymphozyten exprimiert. Auch auf anderen Zellen wie Monozyten, B-Lymphozyten oder dendritischen Zellen wird CD137 nach Aktivierung exprimiert (Schwarz *et al.*, 1995; Pauly *et al.*, 2002). Die Expression von CD137 auf einer Reihe von Immunzellen spiegelt die Wichtigkeit seiner Rolle im Immunsystem wieder. So fördert die Stimulation von CD137 auf T-Lymphozyten wie CD4⁺- und CD8⁺-Zellen die Produktion proinflammatorischer Zytokine und führt zur Proliferation (Pollok *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994; Hurtado *et al.*, 1995). Außerdem stellt CD137 ein wichtiges kostimulierendes Molekül bei der Differenzierung von T-Lymphozyten dar. Diese wiederum exprimieren u.a. den FasL, welcher die Fähigkeit besitzt Tumorzellen in die Apoptose zu treiben (Ebata *et al.*, 2001).

1.3.2 REGULATION UND FUNKTION DES CD137-/CD137-LIGANDEN-SYSTEMS

Innerhalb der TNFR-Superfamilie ist die bidirektionale Signalübertragung am besten im CD137-/CD137-Ligand-System untersucht (Shao und Schwarz, 2011). Auf der Seite des CD137-Liganden führt die Bindung in den Antigen-präsentierenden Zellen über TNFRI zur Proliferation, Differenzierung und zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 oder TNF α (Langstein *et al.*, 1998; Langstein *et al.*, 1999; Moh *et al.*, 2013; Abbildung 5).

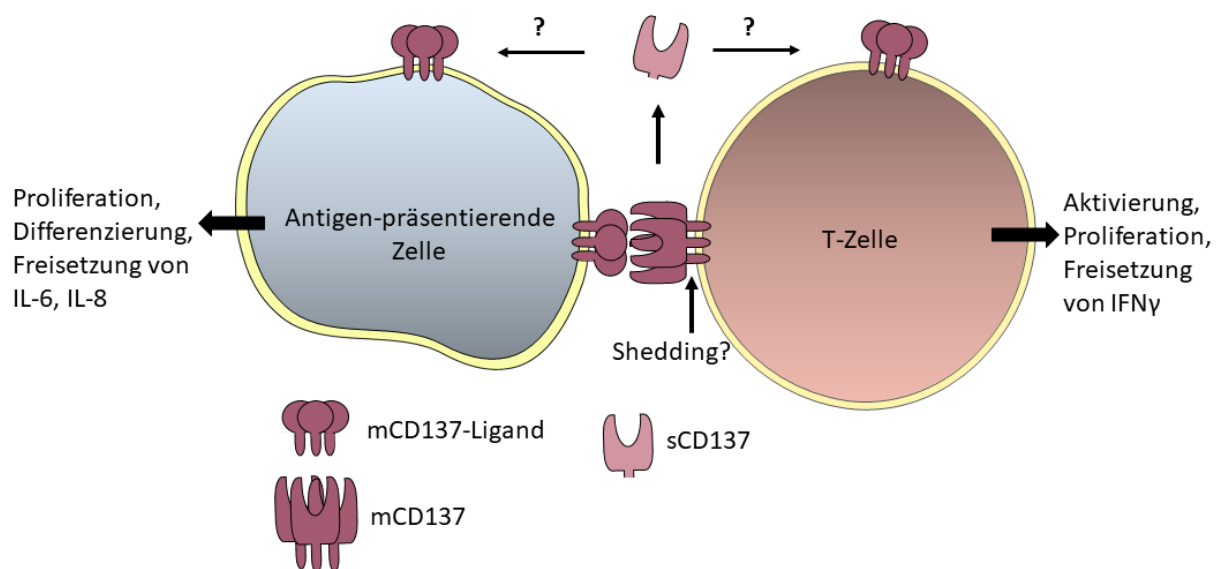


Abbildung 5: Schematische Darstellung der bidirektionalen Signalübertragung des CD137/CD137-Liganden-Systems. Die Interaktion zwischen CD137 und seinem Liganden führt zur Trimerisierung, wodurch sowohl in T-Zellen als auch in den Antigen-präsentierenden Zellen Signalwege aktiviert werden (modifiziert nach Dharmadhikari *et al.*, 2016).

Die Bindung von membranständigem Rezeptor (mCD137) und membranständigem Liganden (mCD137-Ligand) führt zur Trimerisierung des Rezeptors, wodurch die intrazelluläre Domäne TRAF1, TRAF2 oder TRAF3 binden kann. Hierdurch kommt es zur Aktivierung des Nf κ B-Signalweges (Jang *et al.*, 1998). Das derzeitige Verständnis des CD137-Liganden-Signalweges ist jedoch noch sehr lückenhaft. Man geht davon aus, dass er über die Signalkaskaden des TNFR abläuft (Moh *et al.*, 2013).

Da alle bisher detektierten löslichen CD137-Formen (sCD137) die extrazelluläre Domäne von mCD137 beinhalten, besitzen sie die Fähigkeit am mCD137-Liganden zu binden (Shao *et al.*, 2008). Man geht davon aus, dass sCD137 so die Interaktion des mCD137 mit seinem mCD137-Liganden stören könnte (Luu *et al.*, 2020).

Die Funktion des sCD137 ist noch nicht endgültig geklärt. Da es derzeit keinen Hinweis darauf gibt, dass es sich bei dem humanen sCD137 auch um ein Sheddingprodukt einer Metalloprotease handeln kann, fehlen bislang Untersuchungen, ob sich die *Splicing*-Variante von der Shedding-Variante in ihrer Funktionalität unterscheiden könnte. sCD137 könnte eine starke Hemmung auf die Immunaktivität ausüben, womit der Einsatz von antagonistischen CD137-Antikörper eine Möglichkeit in verschiedenen Autoimmunerkrankungen bietet um Entzündungsreaktionen zu dämpfen (Melero *et al.*, 2008; Dharmadhikari *et al.*, 2016; Luu *et al.*, 2020).

1.3.3 CD137 UND SEINE ROLLE IN ERKRANKUNGEN

Sowohl CD137 als auch CD137-Ligand werden in verschiedenen malignen Tumoren wie z.B. Lungenkrebs, Leukämie oder Darmkrebs (Furtner *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Grimmig *et al.*, 2019) exprimiert. Die Funktion und biologische Bedeutung von CD137 in Tumoren ist bislang noch unklar. Neueste Daten zeigen aber, dass maligne Zellen vermehrt CD137 in löslicher Form freisetzen. Man geht davon aus, dass sCD137 so die CD137L-vermittelte T-Zell-Kostimulation blockiert und die Antitumor-Antwort verhindert wird (Labiano *et al.*, 2016). Derzeit gibt es zwei vielversprechende agonistische CD137-Antikörper, Urelumab und Utomilumab, welche bereits zur Behandlung von Tumorerkrankungen genutzt werden (Chester *et al.*, 2018).

sCD137 gilt bislang nicht als alleiniger Marker für eine bestimmte Erkrankung, da es bei den meisten Leukämie- und Lymphomarten erhöht im Serum der Patienten vorkommt (Furtner *et al.*, 2005). Zusätzlich können auch erhöhte sCD137-Level in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (Michel *et al.*, 1998), Atherosklerose (Yan *et al.*, 2013) und multipler Sklerose (Sharief, 2002) nachgewiesen werden. Im Serum von Typ-I-Diabetikern findet man hingegen deutlich weniger sCD137 (Itoh *et al.*, 2019). Trotz dieser widersprüchlichen Berichte wird davon ausgegangen, dass erhöhte sCD137-Spiegel auf ein eher spezifisches Stadium der Immunaktivierung hinweisen. *In vitro*-Experimente zeigten außerdem, dass CD137 von hochaktivierten human T-Zellen exprimiert wird und dass die sCD137-Freisetzung mit dem induzierten Zelltod einhergeht. Dies lässt auf die Rolle von CD137 bei der negativen Rückkopplungsregulation von Immunantworten schließen. So wird vermutet, dass sCD137 als *Decoy* für den CD137-Liganden wirken könnte, um eine weitere Aktivierung des membrangebunden CD137 zu verhindern (Michel und Schwarz, 2000).

2 ZIELSETZUNG

CD137 ist ein Mitglied der TNFR-Superfamilie und kommt als Typ I-Transmembranprotein vor. Es wird überwiegend von aktivierten T-Lymphozyten exprimiert und die Rezeptoraktivierung wird durch Bindung des CD137-Liganden initiiert, wodurch membrangebundenes CD137 (mCD137) trimerisiert. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu Proliferation, Aktivierung und IFN γ -Freisetzung der T-Zellen. Der CD137-Ligand ist auf Antigen-präsentierenden Zellen und aktivierten T-Zellen präsent und wird bei Bindung des Rezeptors ebenfalls aktiviert. Da sowohl der CD137-Rezeptor als auch der -Ligand zur Aktivierung der jeweiligen Zelle führt, spricht man hier von einer bidirektionalen Signalübertragung. In den Antigen-präsentierenden Zellen kommt es nach Bindung zur Expression von proinflammatorischen Zytokinen. CD137 kommt sowohl membrangebunden als auch in löslicher Form (sCD137) vor. In Zellen, welche in entzündlichen Regionen einiger Autoimmunerkrankungen, wie Morbus Crohn oder Psoriasis, eine Rolle spielen, wurde eine erhöhte Expression von CD137 auf den Zellen festgestellt. In Seren von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie z.B. rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose, wurden erhöhte sCD137-Level gefunden, wobei die genaue Funktion derzeit ungeklärt ist. Bislang wurde angenommen, dass es sich bei der löslichen Form von CD137 um *Splicing*-Varianten handelt. Jedoch werden zahlreiche Mitglieder der TNFR-Superfamilie durch Sheddasen freigesetzt.

Die Hauptsheddase der TNFR-Superfamilie ist ADAM17, allerdings können einige der Mitglieder auch durch ADAM10 freigesetzt werden. Diese beiden Proteasen gehören zur Familie der ADAMs (*a disintegrin and metalloprotease*) und sind an grundlegenden Prozessen der Zellproliferation und Signaltransduktion beteiligt.

Das Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob Proteasen an der Freisetzung von CD137 beteiligt sind und diese gegebenenfalls zu identifizieren. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob und welche Funktion sCD137, welches durch proteolytisches Shedding freigesetzt wurde, haben könnte. Schlussendlich sollten noch Seren von Patienten mit Psoriasis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn auf das Vorhandensein von sCD137 überprüft werden. Diese Erkenntnisse könnten zum tieferen Verständnis der CD137-Funktion beitragen und helfen therapeutische Ansätze zu optimieren.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALEN

Tabelle 3: Materialien

96-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, DE
12-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, DE
96-Well-Zellkulturplatten	Sarstedt, DE
96-Well-Mikrotiterplatten, weiß	Brand, DE
Corning™Costar™Transwell™ 24-Well, 0,4 µM Porengröße	Corning, US
Einfrier-Behälter Nalgene® Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, US
Frischhaltebox, luftdicht	EMSA, DE
Gel-Blotting-Papiere Whatman 1,5mm	Carl Roth, DE
Mikro-Schraubröhre, 2 ml	Sarstedt, DE
Mikrotiterplatten, 96-Loch, flacher Boden	Sarstedt, DE
Mikrotiterplatten, 96-Well, flacher Boden, ELISA	Greiner Bio One, DE
Mikrotiterplatten PCR MicroAmp® optical 96 well reaction plate, Real-Time PCR	Life Technologies, US
Mikrotiterplatten-Folie <i>Optical Adhesive film, Real-Time PCR</i>	Life Technologies, US
Pasteurpipetten	Carl Roth, DE
PCR-Reaktionsgefäß Multiply®-µStrip (200 µl)	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen (1000, 200, 20 µl)	Sarstedt, DE
Pipettenspitzen mit Filter (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt, DE
Reaktionsgefäße 2 ml, 1,5 ml	Sarstedt, DE
Roti®-PVDF-Membran, 0,45 µm	Carl Roth, DE
Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, DE
Zellkulturflaschen, T75	Sarstedt, DE
Zellkulturschalen ø 10 cm	Sarstedt, DE
Zellschaber, 16 cm, 25 cm	Sarstedt, DE
Zellzählkammern, SD100	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifugenröhrchen, 50 ml und 15 ml	Sarstedt, DE

3.2 CHEMIKALIEN

Tabelle 4: Chemikalien

1,10-Phenanthrolin	Carl Roth, DE
2-Mercaptoethanol	Carl Roth, DE
Acetat	Carl Roth, DE
Agar-Agar	Carl Roth, DE
Agarose	Carl Roth, DE
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, DE
Ampicillin	Carl Roth, DE
Biocoll (Ficoll)	Merck, DE
<i>Biofreeze</i> Einfriermedium	Biochrom, DE
BM Blue POD-Substrat	Roche, CH
<i>Bovine serum albumin</i> (BSA)	Sigma-Aldrich, US
CD4 ⁺ Microbeads	Miltenyi, US
CD8 ⁺ Microbeads	Miltenyi, US
CD3 Antikörper pure (OKT3)	Miltenyi, US
CD28 Antikörper pure (15E8)	Miltenyi, US
cOmplete™, Protease-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Desoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, DE
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth, DE
Dithiothreitol (DTT)	Fermentas, DE
DNA-Ladepuffer, 6x <i>Loading Dye</i>	Fermentas, DE
DNA-Marker, <i>Generuler</i> ™ 100 bp <i>DNA ladder</i>	Fermentas, DE
Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> (DMEM) <i>High Glucose</i> (4,5 g/l)	Thermo Fisher Scientific, US
ECL™ <i>Select Western Blotting Detection</i> Reagenzien	GE Healthcare, US
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, DE
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, US
<i>GelRed</i> ® <i>Nucleic Acid Gel Stain</i>	Biotium, US
GI254023X (GI)	Tocris Bioscience, UK
Gibco™ Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Thermo Fisher Scientific, US
Gibco™ <i>Sterile Distilled Water</i>	Thermo Fisher Scientific, US
Glucose	Carl Roth, DE
Glycerin	Carl Roth, DE

Glycin	Carl Roth, DE
GW280264X (GW)	AOBIOUS, US
Hefeextrakt	Carl Roth, DE
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific, US
Ionomycin (IO), freie Säure	Merck Millipore, DE
Isopropanol	Carl Roth, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Merck Millipore, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck Millipore, DE
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck Millipore, DE
Marimastat (MM)	Tocris Bioscience, UK
Melittin (Mel)	Hergestellt von J. Andrä (FZ Borstel)
Methanol	Carl Roth, DE
Milchpulver	Carl Roth, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, DE
Penicillin/Streptomycin (P/S), 100x	PAA Laboratories, US
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich, US
PhosSTOP™, Phosphatase-Inhibitor-Mix	Roche, CH
Pierce™ 660nm-Reagenz	Thermo Fisher Scientific, US
Proteinmarker, <i>Prestained Protein Marker</i>	New England Biolabs, US
Propidium Iodid	Novus Biological, US
<i>Rosswell park memorial institute medium</i> (RPMI) 1640	Thermo Fisher Scientific, US
Rotiphoese Gel 30 % (Acrylamid/Bisacrylamid 37, 5:1)	Carl Roth, DE
Saccharose	Carl Roth, DE
Salzsäure, rauchend (HCl)	Carl Roth, DE
Schwefelsäure, 2 N (H ₂ SO ₄)	Carl Roth, DE
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich, US
Taq-Polymerase	Sigma Aldrich, US
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, DE
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, DE
Triton X-100	Carl Roth, DE
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth, DE
Trypanblau	Sigma-Aldrich, US

Trypsin-EDTA, 10x	PAA Laboratories, US
Turbofect	Thermo Fisher Scientific, US
Tween20	Carl Roth, DE

3.3 KITS

Tabelle 5: Kits

CD137- ELISA DuoSet (human)	R&D Systems, US
Cell Titer Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega Corporation, US
IL-8-ELISA DuoSet (human)	R&D Systems, US
JESS Separation Module, 25 capillary cartridges, 12-230 kDa	Protein Simple, US
Nucleo-Spin RNA Kit	Macherey-Nagel, DE
Plasmid Midi-Prep	Roche, CH
PrimeScript™ RT Master Mix Kit	Takara Bio Inc, JP
SYBR Green Premix Taq II	Takara Bio Inc, JP

3.4 GERÄTE

Tabelle 6: Geräte

-80 °C Gefrierschrank Forma 900	Thermo Fisher Scientific, US
Absaug-Pumpe, BVC <i>professional</i>	Vacuubrand, DE
Agarose Gelkammer	Bio-Rad, US
Analysenwaage S-603	Denver Instruments, US
Analysenwaage XS205	Mettler Toledo, US
autoMACS pro Separator	Miltenyi, US
Brutschrank HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, US
CytoFLEX Durchflussszytometer	Beckman Coulter, US
Einkanalpipetten	Brand, DE
Einkanalpipetten	Abimed, DE
Heizblock, <i>Thermomixer comfort</i>	Eppendorf, DE
Infinite® M Plex	Tecan Trading, CH
JESS Simple Western System	Protein Simple, US
Magnetrührer CB162	Bibby Scientific, UK
Mehrkanalpipette	Abimed, DE
Mikrowelle	Samsung, KR
Multi-Imagingsystem <i>Fusion FX7</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE

Multiscan SkyHigh Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, US
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, US
<i>PCR UV Workstation</i>	Analytik Jena, DE
PerfectBlue™ Doppelgelsystem Twin S	PEQLAB Biotechnologie, DE
PerfectBlue™ <i>Tank-Elektroblotter Web S</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
pH-Meter ph211	Hanna Instruments, IT
QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, US
Rollentisch, RS-TR10	Phoenix Instruments, DE
Spannungsgeber EV231	PEQLAB Biotechnologie, DE
Spannungsgeber, PAC 300	Bio-Rad, DE
Spektrophotometer, Nanodrop 1000	PEQLAB Biotechnologie, DE
Sterilwerkbank	Köttermann, DE
Stickstoff Lagertank	Cryotherm, DE
<i>Thermocycler, Peqstar 96 Universal Gradient</i>	PEQLAB Biotechnologie, DE
UV-Transilluminators <i>UVP Gel Solo Gel Documentation System</i>	Analytik Jena, DE
Vortexer, <i>Vortex Genie</i>	IKA, DE
Wärmeschrank	Memmert, DE
Wasseraufbereitungssystem TKA <i>GenPure</i>	TKA, DE
Wasserbad GFL1004	GFL, DE
Zellzählgerät, Cellometer® Auto 1000	Nexcelom Bioscience, US
Zentrifuge 5417R, Festwinkelrotor F45-30-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5424, Festwinkelrotor F45-24-11	Eppendorf, DE
Zentrifuge 5810R, Ausschwingrotor A-4-62	Eppendorf, DE
Zentrifuge, Haraeus Multifuge X3R	ThermoFisher, US

3.5 ANTIKÖRPER

3.5.1 PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 7: Primäre Antikörper

Antigen/ Bezeichnung	Firma	Immunisierte Spezies	Verdünnung <i>Western Blot</i>	Verdünnung <i>Simple Western</i>
tGFP, polyclonal (PA5-22688)	Invitrogen, US	Kaninchen	-	1:20
Tubulin, E7	DSHB, US	Maus	-	1:20
CD137L, polyclonal (AF2295)	R&D Systems, US	Ziege	1:500	-
Actin, I-19	Santa Cruz Biotechnology, US	Ziege	1:1000	-

CD137-VioBright-FITC Antikörper (REA765)	Miltenyi, US	-	-	-
---	--------------	---	---	---

3.5.2 SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Tabelle 8: Sekundärer Antikörper

Antigen	Firma	Immunisierte Spezies	Gekoppelt mit	Verdünnung WB	Verdünnung Simple Western
Anti-Kaninchen	Jackson Immuno- research, US	Ziege	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000	
Anti-Maus	Jackson Immuno- research, US	Schaf	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000	
Anti-Ziege	Jackson Immuno- research, US	Esel	<i>Horseradish peroxidase</i>	1:10.000	
Anti-Maus	Protein Simple, US	-	<i>Horseradish peroxidas</i>	-	1:50

3.6 PLASMIDE

Tabelle 9: Plasmide

Name	Vektor	Herkunft
CD137-tGFP	pCMV6-AC-GFP	OriGene, US
ANO6-D408G-mCherry (TMEM16F)	pReceiver (EX-I1781-M55)	AG Reiss, Martin Veit
Kontrollvektor	pcDNA3.1	ThermoFisher, US
ADAM10	pcDNA3.1	Maretzky <i>et al.</i> , 2005
ADAM17	pcDNA3.1	Gilian Murphy, UK

3.7 SOFTWARE

Tabelle 10: Software

Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, US
ImageJ (1.51j8)	National Institutes of Health, US
SnapGene (5.2.4)	GSL Biotech LLC, US
Adobe Photoshop CS4 (Version 11.0)	Adobe Systems, US
Mendeley Desktop (Version 1.19.2)	Mendeley, UK
Olympus Fluoview 10 (Version 4.2)	Olympus, JP
GraphPad Prism 9 (Version 9.0.1)	GraphPad Software, US
FlowJo (Version 10.6.2)	TreeStar, US

QuantStudio Software	ThermoFisher, US
Compass for SW	Protein Simple, US

3.8 ZELLINIEN

HT-29

Die kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie HT-29 (HT29) mit epithelialen Eigenschaften wurde aus einem primären kolorektalen Adenokarzinom 2. Grades einer 44-jährigen kaukasischen Frau gewonnen. Die Zellen sind adhärent und werden in DMEM-Medium mit Zusätzen (DMEM +/+) kultiviert.

HEK293T Wildtyp

Die ursprünglich aus humanen embryonalen Nierenzellen stammenden HEK293T-Zellen (*human embryonic kidney*, HEK WT) wurden mit dem Simian-Virus 40 transformiert. Es handelt sich hierbei um adhärente Zellen, welche in DMEM +/+ kultiviert werden.

ADAM10/ADAM17-defiziente HEK293T

ADAM10 und ADAM17 wurden in HEK293T WT Zellen mittels CRISPR/Cas-9 ausgeschaltet (HEK dKO; Riethmueller *et al.*, 2016). Die Zellen sind adhärent und werden in DMEM +/+ kultiviert.

THP-1

Die monozytäre Zelllinie THP-1 (THP1) wurde aus Zellen eines einjährigen Patienten mit akuter Leukämie gewonnen (Tsuchiya *et al.*, 1980). Diese Suspensionszellen werden in RPMI-Medium mit Zusätzen (RPMI +/+) subkultiviert. Durch PMA lassen sie sich zu Makrophagen ausdifferenzieren und werden dabei adhärent (Denholm und Stankus, 1995).

HL-60

Die promyeloiden Zelllinie HL-60 (HL60, *human promyelocytic leukemia cells*) wurde aus dem Blut einer 36-jährigen Leukämiepatientin gewonnen. Diese Suspensionszellen werden in RPMI +/+ subkultiviert (Gallagher *et al.*, 1979).

Humane primäre T-Lymphozyten

Primäre humane T-Lymphozyten wurden entweder aus Leukozytenrückhaltesystemen (LRS) von Spendern aus der Transfusionsmedizin oder aus Vollblut selbst präpariert (siehe 3.9.6). Es

handelt sich hierbei um Suspensionszellen, die in RPMI +/- subkultiviert wurden. Lymphozytenkonzentrate gesunder Spender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt. Vollblut wurde von gesunden Spendern verwendet.

3.9 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

3.9.1 KULTIVIERUNG VON ZELLEN

Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37 °C unter 5 % CO₂ mit wassergedämpfter Atmosphäre in einem Brutschrank. Alle verwendeten Lösungen, Medien und Materialien wurden steril verwendet und alle Arbeiten unter der Sterilwerkbank durchgeführt. Die adhärenenten Zelllinien HT29, HEK WT und HEK dKO wurden in Zellkulturschalen (Ø 10 cm) mit 10 ml DMEM +/- kultiviert. THP1, HL60 und T-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 50 ml RPMI +/- kultiviert. Alle verwendeten Medien wurden bei 4 °C gelagert und vor dem Gebrauch bei 37 °C im Wasserbad erwärmt.

Kulturmedium +/-	10 % FCS (v/v) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in DMEM -/- (ohne Zusätze) oder RPMI -/- (ohne Zusätze)
PBS pH 7,2	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 10,1 mM Na ₂ HPO ₄
Trypsin-EDTA	0,05 % in PBS

Die Suspensionszellen wurden bei einer zu hohen Dichte in der gewünschten Menge in eine neue Zellkulturflasche mit frischem RPMI +/- überführt.

Bei einer Konfluenz von 80-90 % wurden die adhärenenten Zellen passagiert. Hierzu wurde das vorhandene Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA über mehrere Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsin ist proteolytisch aktiv und wird zum Lösen adhärenenten Zellen von Zellkulturschalen verwendet. Um das Trypsin abzustoppen, wurden die Zellen in 5 ml DMEM +/- aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und auf neuen Platten subkultiviert. Die Zellen wurden dann durch Auf- und Abpipettieren mit

einer serologischen Pipette vereinzelt und ein Teil der Zellen in neue Kulturschale mit DMEM +/- überführt.

3.9.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

Für jedes Experiment wurde jeweils die gleiche Anzahl an Zellen zu Beginn des Experiments ausgesät. Hierzu wurden die Suspensionszellen direkt bzw. die adhärenenten Zellen nach Ablösung durch Trypsin und Abstoppen mit DMEM +/- in ein 50 ml Sarstedt-Röhrchen überführt. 25 µl Zellsuspension wurden mit 25 µl 0,4 % (w/v) Trypanblau-Lösung versetzt und mit dem Zellzahlgerät Cellometer Auto1000 gezählt. Trypanblau kann durch zerstörte Membranen in tote Zellen gelangen und diese so anfärben, womit sie von lebenden Zellen unterschieden werden können. Lebende Zellen hingegen bleiben farblos. Für die Aussaat wurde die Lebendzellzahl verwendet und anhand dieser eine definierte Zellmenge ermittelt.

3.9.3 KRYOKONSERVIERUNG

Zur langfristigen Aufbewahrung der eukaryotischen Zellen wurden diese mit speziellem Einfriermedium (Biofreeze) bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Suspensionszellen wurden direkt und die adhärenenten Zellen nach Ablösung von der Zellkulturschale bei 300 xg für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 1 ml Biofreeze aufgenommen und in Schraubdeckelröhrchen und in einem Einfrierbehälter gelagert. Der Einfrierbehälter war mit Isopropanol gefüllt und ermöglicht eine gleichmäßige Herunterkühlung bei -80 °C (-1 °C/min) der Zellen. Nach 48 h Lagerung der Zellen in dem Einfrierbehälter bei -80 °C kamen sie zur endgültigen Lagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach Entnahme aus dem Stickstofftank im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Anschließend konnten die Zellen in 10 ml vorgewärmten Kulturmedium mit Zusätzen in Zellkulturschalen überführt werden. Das Medium wurde 24 h nach dem Auftauen erneuert.

3.9.4 TRANSIENTE TRANSFEKTION

Transfektion bezeichnet die Aufnahme fremder Nukleinsäuren, wie die von *E. coli* hergestellte Plasmid-DNA, in eukaryotische Zellen. Die transiente Transfektion der HT29-, HEK WT- und HEK dKO-Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes TurboFect™.

Für die Transfektion wurden die Zellen in 6-Well- oder 12-Well-Platten ausgesät und vorab 24 h inkubiert. Das Pipettierschema für einen einfachen und doppelten Transfektionsansatz

ist in Tabelle 11 aufgeführt. Vor Zugabe des Transfektionsreagenzes wurde das alte Medium der Zellen in jedem Well auf 1 ml frisches RPMI/DMEM +/- gewechselt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur des jeweiligen Transfektionsansatzes wurde die Zellen mit dem jeweiligen Ansatz versetzt.

Tabelle 11: Pipettierschema für Transfektionsansätze

	DMEM +/-	Plasmid	TurboFect
Einfachtransfektion	100 µl	1000 ng Plasmid	3 µl
Doppeltransfektion	100 µl	500 ng Plasmid A + 500 ng Plasmid B	3 µl

48 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere Experimente verwendet.

3.9.5 INHIBITION UND STIMULATION IN ZELLKULTUREXPERIMENTEN

Die Inkubation der jeweiligen Inhibitoren und Stimulanzen mit den Zellen erfolgte in RPMI/DMEM +/- . Hierdurch sollten mögliche Einflüsse von Antibiotika oder Wachstumsfaktoren im FCS vermieden werden. Gegebenenfalls wurde die Zellen vorher mit einem Expressionsvektor transfiziert. Die verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete Inhibitoren und Stimulanzen

	Bezeichnung	Verwendung	Konzentration
Inhibitoren	Marimastat (MM)	Breitband-Metalloprotease-Inhibitor	10 µM
	GI254023X (GI)	ADAM10-Inhibitor	3 µM
	GW208264X (GW)	ADAM10/-17-Inhibitor	3 µM
Stimulanzen	Ionomycin (IO)	Kalzium-Ionophor	1 µM
	PMA	Proteinkinase C-Aktivator	200 ng/ml
	Melittin (Mel)	Bienengift-Komponente	1 µM

3.9.6 LYMPHOZYTEN-ISOLATION DURCH DICTEGRADIENTENZENTRIFUGATION

Durch Dichtegradientenzentrifugation von peripherem Blut können mononukleäre Zellen von anderen Blutzellen über ihre spezifische Dichte voneinander separiert werden. Mit PBS verdünntes Vollblut im Verhältnis 1:2 oder LRS-Konzentrat im Verhältnis 1:5 wurde auf eine Ficoll-Trennlösung mit einer Dichte von 1,077 g/ml geschichtet. 30-35 ml des Blutes wurden hierbei auf 15 ml Ficoll geschichtet. Das Gemisch wurde anschließend 20 min bei 700 rpm, RT und ohne Bremse in einem Ausschwing-rotor zentrifugiert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen

Dichte trennen sich die Zellen in verschiedene Fraktionen (Abbildung 6). Im Überstand befindet sich das Blutplasma, im Interphasering die Lymphozyten und unterhalb des Ficolls pelletieren Granulozyten und Erythrozyten. Der Interphasering mit den *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurde mit einer serologischen Pipette vorsichtig abgenommen, gesammelt und zweimal mit mindestens 30 ml PBS für 10 min bei 300 xg und RT zentrifugiert und so gewaschen. Anschließend wurden die Lymphozyten mittels autoMACS (Miltenyi) separiert.

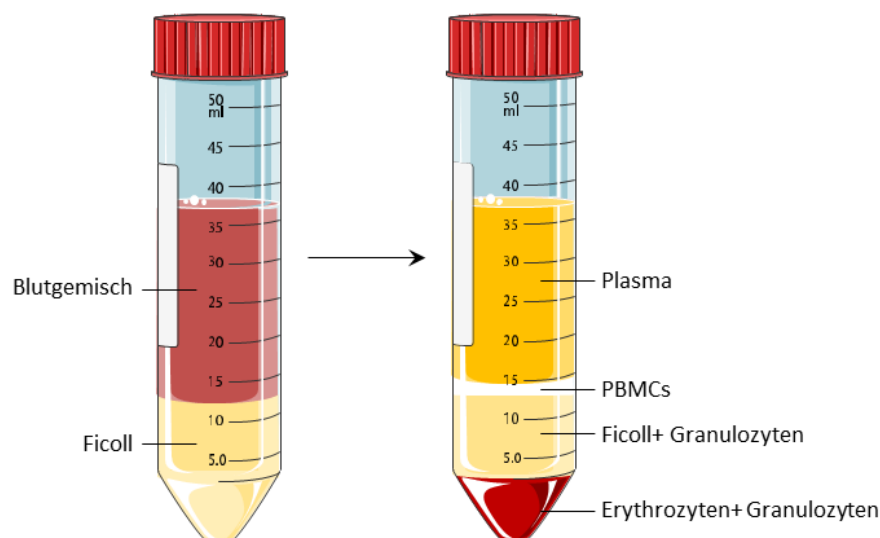


Abbildung 6: Fraktionierung des Blutes durch Dichtegradientenzentrifugation. Aufgrund ihrer spezifischen Dichte werden die Blutzellen beim Zentrifugieren mit Ficoll aufgetrennt und in die einzelnen Fraktionen aufgeteilt.

3.9.7 ZELLSEPARATION MITTELS MAGNET-AKTIVIERTEM ZELLSORTER (MACS)

Definierte T-Zell-Subpopulationen können mittels einer magnetischen Separation aus Lymphozyten gewonnen werden. Hierfür wurden monoklonale Antikörper (mAk) verwendet an die magnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Diese mAk sind gegen definierte Oberflächenantigene, in diesem Fall CD4 oder CD8, gerichtet. Die dabei herauskommenden Zellen sind entweder CD4⁺ oder CD8⁺, da sie das jeweilige Antigen besitzen. Die Lymphozyten wurden in 50 ml Sarstedt-Röhrchen bei 400 xg für 5 min und RT zentrifugiert. Auf das Pellet wurden dann je $1 \cdot 10^7$ Zellen 100 µl der jeweiligen Microbeads gegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit MACS-Puffer (MP) gewaschen und dafür bei 300 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Die positiv markierten Zellen wurden dann mittels eines magnetischen Feldes im autoMACS (Miltenyi) selektiert und anschließend die für die folgenden Experimente nötige Zellzahl ausgesät.

MACS-Puffer (MP)	500 ml PBS
	2 mM EDTA
	0,5 % (w/v) BSA

3.9.8 OBERFLÄCHENFÄRBUNG UND DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Um Oberflächenmoleküle auf den Zellen zu markieren, wurden Fluorchrom-gekoppelte Antikörper verwendet. Die Zellzahl der jeweiligen Proben wurde auf $1 \cdot 10^7$ Zellen eingestellt. Danach wurden die Zellen mit MP bei 400 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann mit dem jeweiligen Antikörper (Konzentration nach Herstellerprotokoll) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl MP bei 400 xg für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und in 200 µl MP aufgenommen und resuspendiert.

Zur Erfassung nekrotischer und apoptotischer Zellen wurde kurz vor der Messung zu jeder Probe 1 µl Propidium Iodid (PI) gegeben. PI hat die Eigenschaft durch die nicht mehr intakte Zellmembran toter Zellen zu gelangen und dort an die DNA zu binden. PI lässt sich anhand eines spezifischen Fluoreszenzsignals detektieren, womit man lebende von toten Zellen unterscheiden kann.

Mit Hilfe der Fluorchrom-gekoppelten Antikörper konnten die Zellen im Durchflusszytometer anhand ihres Fluoreszenzsignals charakterisiert werden. Durch einen Laser wurden die Fluorochrome angeregt, die daraufhin Licht mit spezifischer Wellenlänge emittieren, welches dann durch Detektoren gemessen werden kann.

3.9.9 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Bei der *Sandwich*-ELISA Methode handelt es sich um eine Antikörper-basierte Methode mit der man spezifische Proteine in einer Probe nachweisen kann. Der Proteinnachweis erfolgte in speziellen *high-binding* 96-Well-Platten über die Bindung des nachzuweisenden Proteins an einen immobilisierten Antikörper. Danach erfolgte eine weitere Bindung des Antigens durch einen Biotin-gekoppelten Antikörper und anschließende Inkubation mit Streptavidin-*horseradish peroxidase* (HRP). Die Quantifizierung des nachzuweisenden Proteins erfolgte dann durch Zugabe und Umsetzung eines chromogenen Peroxidase-Substrates (Tetramethylbenzin, TMB). Die enzymatische Reaktion wurde mit Schwefelsäure abgestoppt und die Absorption der Umsetzungsreaktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Die Referenzwellenlänge betrug 620 nm. Die Proben wurden immer in Doppelwerten gemessen. In dieser Arbeit wurden nur DuoSet ELISAs der Firma R&D nach Herstellerangaben benutzt.

Wasch-Puffer	0,05 % Tween20 (v/v) in PBS
Reagenz-Lösung	1 % BSA (w/v) in PBS
Stopp- Lösung	2 M H ₂ SO ₄

3.9.10 ATP-BASIERTER PROLIFERATIONSASSAY

Die Proliferation und Viabilität der Zellen wurde mittels *CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay* detektiert. Hierbei wird ATP, welches mit der Anzahl lebender Zellen korreliert, gemessen. Zellfreie Überstände von Anoctamin-6- und CD137-transfizierten HEK-Zellen oder zellfreie Überstände von nur Anoctamin-6 transfizierten HEK-Zellen wurden über 24 h gesammelt. 50.000 CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen/Well wurden in einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen entweder mit zellfreien Überständen von Anoctamin6- und CD137-transfizierten HEK-Zellen oder mit zellfreien Überständen von nur CD137-transfizierten HEK-Zellen inkubiert. Nach weiteren 72 h erfolgte der Proliferationsassay nach Herstellerangaben. Jede Probe wurde in Dreifachwerten gemessen und als Tot-Kontrolle wurden Zellen mit 0,2 % Triton X-100 behandelt.

3.10 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

3.10.1 PROTEINEXTRAKTION AUS ZELLEN

Für die *Western Blot*- und *Simple Western*-Analyse war eine Proteinextraktion aus den Zellen erforderlich. Das Kulturmedium bzw. der Überstand der Zellen wurde hierzu entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden auf eine 6-Well-Platte 200 µl/Well Lysepuffer gegeben. Zur zusätzlichen mechanischen Lyse wurden die Zellen mindestens dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut.

Lysepuffer pH 7,4	5 mM TRIS
	1 mM EGTA
	250 mM Saccharose
	1 % (v/v) Triton X-100
	10 mM 1,10-Phenanthrolin
	1x <i>Complete</i> Protease-Inhibitor-Mix
	1x <i>PhosStop</i> Phosphatase-Inhibitor-Mix

Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Platte gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei 12.000 xg bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände

wurden dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnten bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

3.10.2 QUANTIFIZIERUNG DES PROTEINGEHALTES

Die Messung des Proteingehalts der Zelllysate erfolgte mittels des *Pierce 660 nm Protein Assay*. Je 6 µl Zelllysate wurde in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und mit 100 µl des 660 nm-Reagenzes versetzt. Danach erfolgte die Messung der Absorption des gebildeten Protein-Farbstoff-Komplexes bei einer Wellenlänge von 660 nm. Zuvor wurde ein Proteinstandard ermittelt mit dessen Hilfe nun der Proteingehalt der Zelllysate berechnet werden konnte.

3.10.3 SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE

Proteine und deren Gemische wurden mittels SDS-PAGE (*sodiumdodecylsulfate polyacrylamidgel electrophoresis*) elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurde das nach Laemmli (1970) beschriebene System verwendet.

Es wurde ein diskontinuierliches Gelsystem verwendet. Hierbei folgt auf ein Sammelgel ein Trenngel, welche beide aus unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen und pH-Werten bestehen. Je 50 µg Protein der jeweiligen Probe wurde hierzu mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 5:1 versetzt und bei 95 °C für 5 min aufgekocht. Die verwendeten Puffer und die Zusammensetzung der Gele ist im Folgenden aufgeführt:

Sammelgel-Puffer pH 6,8	0,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
Trenngel-Puffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % (w/v) SDS
APS	10 % (w/v) APS
Sammelgel 4,5 %	0,835 ml Rotiphorese Gel 30 1,25 ml Sammelgel-Puffer 2,9 ml H ₂ O 15 µl TEMED 30 µl APS
Trenngel 10 %	3,33 ml Rotiphorese Gel 30 2,5 ml Trenngel-Puffer 4 ml H ₂ O 30 µl TEMED 60 µl APS

SDS-Probenpuffer	2 % (w/v) SDS
	10 % (w/v) Glycerin
	125 mM Tris
	1 mM EDTA
	20 mM DTT
	0,01 % Bromphenolblau

Das Gießen der Gele erfolgte mit Hilfe eines vertikalen Gelsystems (PeqLab). Nach erfolgter Polymerisierung wurden die Gele in der Elektrophorese-Apparatur platziert und diese mit SDS-Laufpuffer aufgefüllt.

SDS-Laufpuffer	25,1 mM Tris
pH 8,8 - 8,9	192 mM Glycin
	0,1 % SDS

Zusätzlich zu den Proben wurde ein Größenstandard mit aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei einer Spannung von 100 V bis kurz vor Austreten der Lauffront aus dem Gel.

3.10.4 WESTERN BLOT

Der Transfer der durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte mittels *Tank Blot*-Verfahren. Dieser Prozess wird als *Western Blotting* bezeichnet. Die Proteine wurden hierbei auf eine 0,45 µm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die Membran wurde zuerst mit Methanol aktiviert und anschließend wie die Filterpapiere (Whatmann) in Transferpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran und das Gel wurden zusammen zwischen je zwei Filterpapiere gelegt und nach Herstellerangaben in die Apparatur eingelegt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte für 120 min bei 150 mV.

Transferpuffer	192 mM Glycin
pH 8,5	25 mM Tris
	10 % Methanol

3.10.5 IMMUNOLOGISCHE DETEKTION

Nach Transfer der Proteine wurde die Membran für 1 h in einer 5 %igen Milchpulverlösung in TBS-T inkubiert. Freie Bindungsstellen auf der Membran werden so blockiert.

TBST-Puffer pH 7,4	20 mM Tris 140 mM NaCl 10 mM EDTA 0,1 % (v/v) Tween20
5 %ige Milchpulver-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBST-Puffer

Danach erfolgte die Inkubation der Membran mit den primären Antikörpern (siehe 3.5.1). Dies erfolgte nach Herstellerangaben entweder für 1 h bei RT oder üN bei 4 °C in einer 5 %igen Milchpulverlösung. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 0) für 1 h bei RT in TBS-T inkubiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschrift der Membran mit TBS-T für je 10 min. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase gekoppelt und wurde mittels *horseradish peroxidase*-katalysierten Chemilumineszenzreaktion detektiert. Für diese Detektion wurde das *ECL Select Western Blotting Detection Reagent* nach Herstellerangaben verwendet. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mittels FX7 Kamerasystem detektiert.

3.10.6 STRIPPEN DER PVDF-MEMBRAN

Bereits verwendete Antikörper, welche an den Proteinen, welche an der Membran lagern, binden, müssen entfernt werden um weitere Proteine detektieren zu können. Dies geschieht durch Inkubation der Membran mit *stripping*-Puffer bei 65 °C für 45 min. Anschließend kann die Membran mit TBS-T gewaschen und wie oben beschrieben mit neuen primären und sekundären Antikörpern gefärbt werden.

Stripping-Puffer pH 6,7	62,5 mM Tris 2 % (w/v) SDS 0,7 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
-----------------------------------	--

3.10.7 SIMPLE WESTERN

Simple Western™ ist ein vollautomatisiertes *Western Blot*-System und wurde nach Herstellerangaben des JESS™ (Protein Simple) verwendet. Jede Probe läuft hierbei in einer eigenen Kapillare, welche mit einem SDS-Gel gefüllt ist. Nach dem Lauf werden die Ergebnisse von der integrierten *Compass*-Software analysiert.

3.11 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

3.11.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Amplifikation von Expressionsvektoren mit dem *Escherichia (E.) coli*-Stamm XL10-Gold (Tet^RΔ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F⁻ proAB lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^R) Amy Cam^R]) gearbeitet. In *E. coli* kann man Plasmide durch Transformation einbringen. Diese können dann in Form von extrachromosomalen zirkulären Plasmiden vervielfältigt werden. Das zu transformierende Plasmid enthält ein Antibiotikaresistenzgen. Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien erfolgte über Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin im Medium. *E. coli* wurde sowohl in flüssigem Luria-Bertani (LB)-Medium oder auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Die Flüssigkultivierung erfolgte hierbei zusätzlich bei 200 rpm.

LB-Medium	10 g/l Trypton 10 g/l NaCl 5 g/l Hefeextrakt
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agar-Agar

3.11.2 KRYOKONSERVIERUNG

Um *E. coli* bzw. einzelne Klone langfristig lagern zu können wurden diese zunächst in 10 ml LB-Medium üN bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Danach folgte die Zentrifugation der Bakterienlösung bei 500 xg für 5 min und RT. Das Kulturmedium wurde abgesaugt, das Pellet in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein Schraubdeckelröhrchen überführt. Anschließend wurden die Bakterien bei -80°C gelagert.

Einfriermedium	85 % (v/v) LB-Medium 15 % (v/v) Glycerin
-----------------------	---

3.11.3 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

Zur Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* wurden diese zunächst auf Eis aufgetaut und 1 h mit 1 µl Plasmid versetzt. Der Transformationsansatz wurde dann 40 s bei 42 °C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis heruntergekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde der Ansatz bei 37 °C und 800 rpm für 1 h inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im

Brutschrank inkubiert. Zur Kultivierung einzelner Klone wurde je eine Kolonie von der Platte gepickt und über Nacht in 250 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

SOC-Medium	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	2,0 % (w/v) Trypton
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	20 mM Glucose

3.12 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.12.1 PLASMIDPRÄPARATION

Für die Plasmidpräparation wurden die jeweiligen Klone der XL10-Gold-Stämme in je 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin üN bei 37 °C bei 250 rpm inkubiert. Zur Gewinnung des Plasmids wurde das *Maxi-Plasmid-Prep Kit* der Firma Roche nach Herstellerangaben verwendet.

3.12.2 QUANTIFIZIERUNG VON DNA UND mRNA

Die Bestimmung der DNA- und mRNA-Konzentrationen von Lösungen erfolgte mittels Spektralphotometer NanoDrop1000 oder Multiscan SkyHigh. Die Geräte messen die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm. Anhand dieser Absorption kann die Konzentration der Probe ermittelt werden. Außerdem wurde das Absorptionsverhältnis der Wellenlänge 260 nm zu 280 nm gemessen um die Reinheit der Proben zu ermitteln.

3.12.3 ISOLATION VON mRNA

Zur Isolation der mRNA aus Zellen wurde das *Nucleo-Spin RNA Kit* der Firma Macherey-Nagel nach Herstellerangaben verwendet. Die RNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop1000 oder Multiscan SkyHigh ermittelt. Während der gesamten Isolation wurden ausschließlich gestopfte RNase-freie Spitzen, sterile Reagenzgefäße und gestopfte Filterspitzen verwendet.

3.12.4 REVERSE TRANSKRIPTION

Nach erfolgreicher Isolierung der mRNA wurde diese mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde das *PrimeScript™ RT Master Mix Kit* der Firma Takara verwendet. 0,5 µg RNA wurde mit 2 µl des 5x *PrimeScript™ RT Master Mixes* und H₂O (ad 10 µl) versetzt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription bei 37 °C für 15 min und

die Inaktivierung des Enzyms bei 85 °C für 5 s im Thermocycler peqSTAR 96 universal. Die Konzentration der cDNA wurde ermittelt und auf 10 ng/ml eingestellt. Während der gesamten Arbeiten wurden ausschließlich RNase-freie Spitzen, sterile Reagenzgefäße und gestopfte Filterspitzen verwendet. Alle Tätigkeiten wurden unter der PCR UV Workstation durchgeführt.

3.12.5 OLIGONUKLEOTIDE

Mit Hilfe der Software *SnapGene* wurden die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide entworfen. Es wurde darauf geachtet, dass die Primer-Paare Intron-überspannend sind, umso eventuell noch vorhandene genomische DNA auszuschließen und nicht mit zu amplifizieren. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Primer eine Länge von 20 Basenpaaren haben, einen GC-Gehalt von ca. 50-60 % aufweisen und ihre Schmelztemperatur bei 55-65 °C liegt. Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich hergestellt und in der folgenden Tabelle aufgelistet (Tabelle 13).

Tabelle 13: Verwendete Oligonukleotide

Gen	Name	Sequenz
hCD137	hsCD137_for	5'-GCCCAAATGTTCTGCTGAT-3'
	hsCD137_rev	5'-CAGCTCCTTCGTGTCCTCTT-3'
hCD137-Ligand	hsCD137L_for	5'-TTGCTGGTCCTCAACTTTGA-3'
	hsCD137L_rev	5'-AACACCTTTACACTGCCTGC-3'
hHPRT1	hHPRT1_for	5'-TGGCGTCGTGATTAGTGATG-3'
	hHPRT1_rev	5'-TCTCGAGCAAGACGTTCACT-3'

3.12.6 SEMI-QUANTITATIVE *REAL-TIME* PCR

Die semi-quantitative Real-Time PCR ist eine Methode zur Schätzung der relativen Expression bestimmter Gene. Verwendet wurden die in 3.12.5 entworfenen Primer-Paare. Um die Spezifität der PCR zu erhöhen wurde eine *touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wird die *annealing*-Temperatur in den ersten Zyklen höher als die optimale Temperatur gewählt. Dadurch entstehen in den ersten Zyklen nur spezifische Produkte, welche in den folgenden Zyklen dann weiter amplifiziert werden. Für die PCR wurden die Taq-Polymerase verwendet und wie folgt zusammenpipettiert:

10 x ThermoPol Reaction Buffer	2,5 µl
10 mM dNTP's (200 nm)	0,5 µl
Forward Primer	0,5 µl
Reverse Primer	0,5 µl
cDNA	1 µl
Taq-Polymerase	0,125 µl
H₂O	19,875 µl

Die PCR wurde im Thermocycler peqSTAR 96 durchgeführt. Das Protokoll für die PCR ist in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Programm für *touchdown*-PCR

Schritt	Temperatur, Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C, 2 min	
Denaturierung	95 °C, 30 s	6 Zyklen
<i>annealing</i>	68 °C, (-1 °C/Zyklus), 30 s	
Elongation	68 °C, 20 s	
Denaturierung	95 °C, 20 s	28 Zyklen
<i>annealing</i>	62 °C, 30 s	
Elongation	68 °C, 20 min	
finale Elongation	68 °C, 5 min	
Kühlung	4 °C, ∞	

3.12.7 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die in 3.12.6 hergestellten Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurden 2,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer erwärmt bis sich eine homogene Lösung bildete. Anschließend wurden 5 µl GelRed der Firma Biotium pro 100 ml Lösung dazugegeben und vermischt. Die Lösung wurde in eine Gelkammer (Bio-Rad) gegeben und bis zum Aushärten des Geles gewartet. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer in die Gelkammer gegeben. Die Proben, wurden zuvor mit 6x *Loading Dye Purple* - Ladepuffer versehen und in je eine Tasche des Gels pipettiert. Neben den Proben wurde ein *Gene Rule 100 bp Ladder* als Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 1-2 h. Das Gel wurde dann mit Hilfe UV-Transilluminators *UVP Gel Solo Gel Documentation System* der Firma Analytik Jena analysiert.

TAE-Puffer	40 mM Tris
pH 8,0	20 mM Acetat
	1 mM EDTA

3.12.8 REAL-TIME PCR

Mit der *Real-Time* PCR kann die mRNA-Expression eines Gens in Geweben und Zellen untersucht werden. Die Expression des jeweils untersuchten Gens wurde hierbei mit einem internen Standard, dem sogenannten *Housekeeping*-Gen, verglichen. Ein *Housekeeping*-Gen wird in Zellen unabhängig von Zellstadium und äußeren Einflüssen gleich stark exprimiert.

Die Spezifität der PCR wurde mit der *touchdown*-Variante erhöht, wie bereits in 3.12.6 erläutert. Es wurde der *SYBR premix EX Taq II-Mix* (Takara) mit dem Farbstoff *SYBR Green I* eingesetzt. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und emittiert so ein Fluoreszenzsignal. Somit lässt sich die Menge der amplifizierten cDNA quantitativ bestimmen. Die Schmelzkurve dient nochmals der Überprüfung der Spezifität der DNA-Fragmente, da die PCR-Produkte spezifische Schmelzkurven besitzen, welche als Fluoreszenzmaximum erkennbar sind. Die *Real-Time* wurde im QuantStudio 3 mit dem in Tabelle 15 dargestellten Programm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *QuantStudio™ Design & Analysis Software*.

Ein 10 µl Standard-Ansatz enthielt 5,2 µl des *SYBR premix Ex Taq II-Mixes* (5x Master Mix + ROX), 1 µl cDNA (10 ng/µl), 0,5 µl *forward* Primer (2,5 µM), 0,5 µl *reverse* Primer (2,5 µM) und 2,8 µl H₂O. Jede Messung erfolgte in Doppelwerten. Um die Ergebnisse auszuwerten, wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode (*cycle threshold*) angewandt:

$$\Delta C_t = C_t (\text{Ziel-Gen}) - C_t (\text{housekeeping-Gen})$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{stimulierte Probe}) - \Delta C_t (\text{unbehandelte Kontrolle})$$

$$\text{x-fache Veränderung} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Tabelle 15: Verwendetes Programm für die *Real-Time* PCR

Schritt	Temperatur, Zeit	
initiale Denaturierung	95 °C, 30 s	
Denaturierung	95 °C, 5 s	6 Zyklen
<i>annealing</i>	68 °C, (-1 °C/Zyklus), 30 sec	
Denaturierung	95 °C, 5 s	40 Zyklen
<i>annealing</i>	62 °C, 30 s	
Denaturierung	95°C, 15 s	Schmelzkurve
<i>annealing</i>	62 °C, 1 min	
finale Denaturierung	95 °C, 15 s	

3.13 STATISTIK

Die statistische Auswertung der Experimente und Daten erfolgte mit Hilfe des Programms *Prism Software* Version 9. Bei zwei oder weniger unabhängig durchgeführten Experimenten wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben. Bei drei oder mehr unabhängig durchgeführten Experimenten der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes

(MW \pm SEM). Es erfolgte eine ein- oder zweifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) einschließlich eines Post-Hoc-Tests nach Bonferroni. Alle Experimente sind entsprechend gekennzeichnet. Zwei Datengruppen wurden als signifikant unterschiedlich angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % (p-Wert < 0,05) liegt. Erhöhte Signifikanzunterschiede wurden mit einem Stern (*) und reduzierte Unterschiede mit einer Raute (#) gekennzeichnet. Bei nicht signifikanten Unterschieden wurde diese mit n.s. gekennzeichnet.

4 ERGEBNISSE

CD137 ist ein Mitglied der TNFR Familie, welches auf einer Vielzahl von Immunzellen, u.a. T-Lymphozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und NK-Zellen, exprimiert wird (Pollok *et al.*, 1993; Schwarz *et al.*, 1995; Kienzle und Von Kempis, 2000; Pauly *et al.*, 2002). Bei Bindung an seinen Liganden CD137L, welcher auf antigenpräsentierenden Zellen (APCs), wie Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen exprimiert wird (Langstein *et al.*, 1998; Shao und Schwarz, 2011), kommt es zu einer bidirektionalen Signalübertragung, erhöhten Proliferation und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen (Langstein *et al.*, 1998; Langstein *et al.*, 1999). Dieser kostimulatorische Prozess dient der Regulation der Immunzellantwort und steht in Verbindung mit inflammatorischen Erkrankungen, wie z.B.: Arteriosklerose oder rheumatoider Arthritis (Michel *et al.*, 1998; Söderström *et al.*, 2018) und einigen Tumorerkrankungen wie Leukämie und Lungenkrebs (Furtner *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008). Angesichts der immer größer werdenden gezielten anti-CD137-Therapie, vor allem in der Tumorforschung, ist es wichtig die Regulation der CD137-Funktion genauestens zu verstehen.

4.1 EINFLUSS VON ADAM10 UND ADAM17 AUF DIE FREISETZUNG VON CD137

CD137 kommt nicht nur in membranständiger, sondern auch in löslicher Form in Maus und Mensch vor. Bislang wurde angenommen, dass es sich bei der löslichen Form um eine *Splice*-Variante handelt.

Da ebenfalls viele Mitglieder der TNFR-Familie durch Metalloproteasen, speziell ADAM17, gesheddet werden (Bell *et al.*, 2007; Reddy *et al.*, 2000; Zunke und Rose-John, 2017), liegt die Vermutung nahe, dass ADAM17 oder die nahverwandte Protease ADAM10 an der Freisetzung von CD137 beteiligt sein könnten.

Um das mutmaßliche Shedding von CD137 durch ADAM10 und -17 zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit HT29- und HEK293T-Zellen mit einem Vektor, welcher für CD137 kodiert, transfiziert. Dieser hatte am C-terminalen Ende zusätzlich ein tGFP. Eine Transfektionskontrolle erfolgte mittels *Simple Western* und Fluoreszenzmikroskopie. Der Einfluss von ADAM10 und -17 auf das mögliche CD137-Shedding wurde anschließend mit Inhibitions- und Stimulationsversuchen untersucht.

4.1.1 METALLOPROTEASE-ABHÄNGIGE FREISETZUNG VON CD137 IN HT29

Durch die Fusionierung von CD137 an tGFP konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie und *Simple Western* die erfolgreiche Transfektion in HT29-Zellen kontrolliert werden (Abbildung 7). Die Ladekontrolle der Expressionsanalyse mittels *Simple Western* mit Tubulin-AKs zeigte sowohl in den pcDNA- (mock) als auch in den CD137-transfizierten Zellen ein ähnlich starkes Signal und somit, dass in jeder Probe gleich viel Protein aufgetragen wurde. Das errechnete Molekulargewicht von CD137 liegt bei 28 kDa, das des tGFPs bei 26 kDa. Zusammengerechnet liegt die errechnete Größe des hier verwendeten Gesamtplasmids bei 54 kDa. In der CD137-tGFP-transfizierten Probe ließ sich mit Hilfe eines Antikörpers, der gegen tGFP gerichtet war, CD137-tGFP nachweisen. Die hier detektierte Bande hatte eine Größe von ca. 66 kDa und konnte nicht in der Kontrolle detektiert werden. Da bekannt ist, dass es bei CD137 zu posttranslationalen Modifikationen kommen kann, liegt das zu erwartende Gesamtmolekulargewicht etwas höher als das Errechnete, weshalb davon ausgegangen wird, dass es sich hierbei um die richtige Bande handelte (Abbildung 7A).

Zusätzlich zeigte der visuelle Nachweis des tGFPs durch Grünleuchten der Zellen im Fluoreszenzmikroskop, dass eine erfolgreiche Transfektion stattgefunden hat (Abbildung 7B).

Bislang wurde nur einmal in murinen Zellen gezeigt, dass lösliches CD137 auch ein Ergebnis proteolytischen Sheddings durch eine unbekannte Metalloprotease sein kann (Taraban *et al.*, 2002). Um die beteiligte Protease zu identifizieren und deren Anteil an der CD137-Freisetzung zu beurteilen, wurden HT29-Zellen nach erfolgreicher CD137-Transfektion in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren inkubiert. Sowohl die Überstände als auch Zelllysate wurden anschließend mittels ELISA auf CD137 untersucht. Das Verhältnis der Menge an CD137 im Überstand zu der Menge in den Lysaten wurde bestimmt und prozentual berechnet. Dadurch ergab sich wieviel des gesamten CD137 in den Zellkulturüberstand freigesetzt wurde. Anschließend wurde damit die x-fache Veränderung berechnet, normiert auf die unbehandelte Kontrolle.

Marimastat (MM) ist ein Breitband-Metalloprotease-Inhibitor, GI ein präferenzialer ADAM10-Inhibitor und GW ein ADAM10- und ADAM17-Inhibitor (Ludwig *et al.*, 2005). Die Behandlung der Zellen mit MM, GI oder GW führte in allen Fällen zu einer signifikanten Reduktion des Sheddings von CD137 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. GI zeigte hierbei einen stärkeren Effekt als GW, MM zeigte den stärksten Effekt. Dies war der erste Hinweis darauf,

dass humanes CD137 durch Metalloproteasen gesheddet werden kann und insbesondere ADAM10 maßgeblich an der Freisetzung beteiligt ist (Abbildung 7C).

Des Weiteren wurde überprüft, ob durch induzierte Aktivierung von ADAM10 und -17 das Shedding von CD137 erhöht wird (Abbildung 7D). Hier wurde die Menge an CD137 im Lysat und den Überständen bestimmt. Das Verhältnis des im Überstand freigesetzten CD137 wurde wieder prozentual zu der Gesamtmenge an CD137 berechnet. Anschließend wurde damit die x-fache Veränderung berechnet, normiert auf die unbehandelte Kontrolle. Durch Ionomycin (IO), welches als Kalzium-Ionophor einen Einstrom von Kalziumionen in die Zelle bewirkt, werden ADAM10 und -17 aktiviert. Melittin (Mel), welches ein Bestandteil von Bienengift ist, bewirkt über die Aktivierung von P2-Rezeptoren und einer Porenformation mittels Lipid-Protein-Interaktion innerhalb der Zellmembran ebenfalls einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Sommer *et al.*, 2012). Hierdurch wird sowohl ADAM10 als auch ADAM17 aktiviert. Der Phorbolester PMA führt hingegen nur zu einer Aktivierung von ADAM17 (Horiuchi *et al.*, 2007; Tu *et al.*, 2008; Le Gall *et al.*, 2009). Die Stimulation der HT29-Zellen mit IO und Mel zeigte in beiden Fällen einen signifikanten Anstieg des CD137-Sheddings im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Der ADAM17-Aktivator PMA hatte jedoch keine Auswirkung. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch IO und Mel zu einem signifikanten Anstieg von sCD137 führt. Da PMA keinen Effekt hatte, ist anzunehmen, dass ADAM10 die Hauptsheddase von CD137 ist (Abbildung 7D).

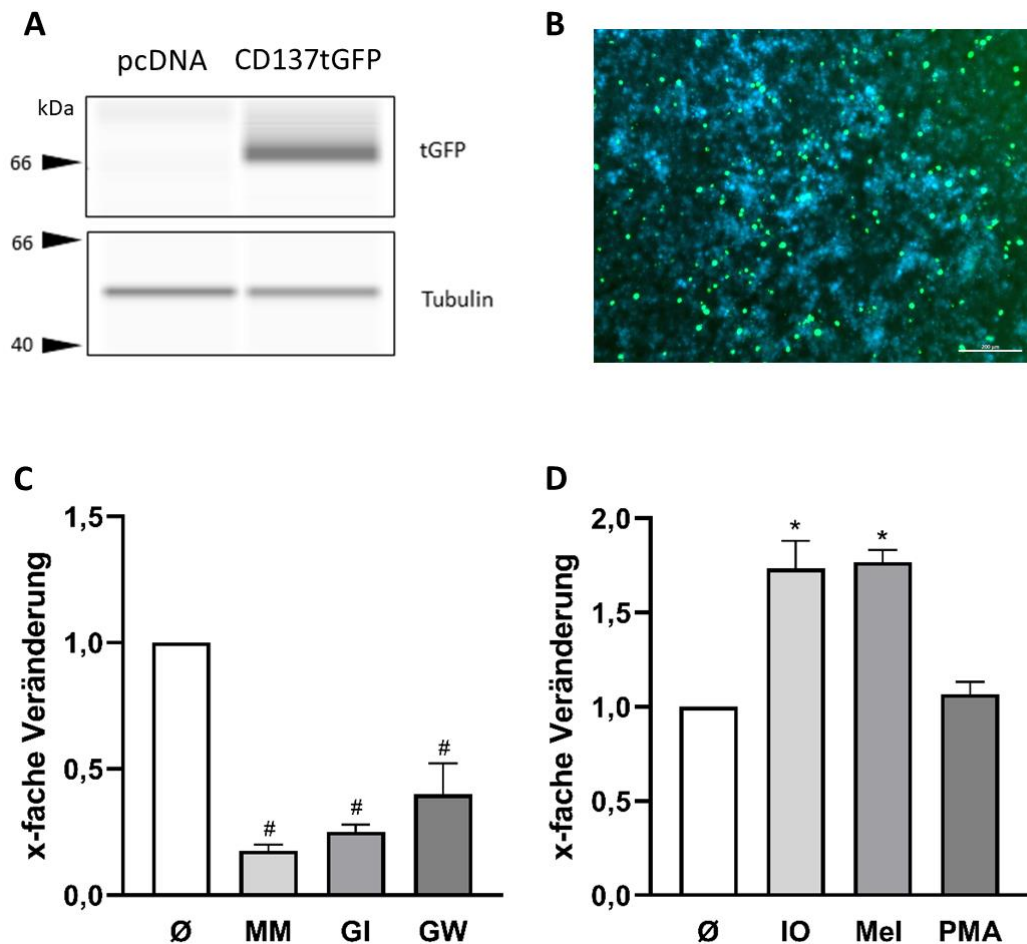


Abbildung 7: Freisetzung von sCD137 wird von ADAM10 und ADAM17 vermittelt. HT29-Zellen wurden mit CD137-tGFP transfiziert (48 h). **(A)** Eine Kontrolle der erfolgreichen Transfektion erfolgte mittel *Simple Western*. Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Ebenfalls als Transfektionskontrolle diente der Nachweis des Fluoreszenzsignals des tGFPs (grün). Mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst 33342 (blau) wurden die Zellkerne angefärbt. Der Maßstab beträgt 200 μ m **(A,B)** Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. **(C,D)** Die CD137-tGFP-transfizierten HT29-Zellen wurden auf die CD137-Menge im Überstand im Verhältnis zur Gesamtmenge CD137 im ELISA analysiert. Die x-fache Veränderung wurde auf die mock-Kontrolle normiert. **(C)** Die Inhibition mit GI (3 μ M), GW (3 μ M) oder MM (10 μ M) erfolgte für 24 h. **(D)** Die Stimulation mit IO (1 μ M) und Mel (1 μ M) erfolgte für 30 min und die Stimulation mit PMA (200 ng/ml) für 2 h. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die jeweils unbehandelte Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen unstimulierten Kontrolle. (n=3 (C, D); */# P < 0,05; MW \pm SEM)

4.1.2 ADAM10 UND ADAM17 SETZEN CD137 IN HEK293T-ZELLEN FREI

Die bisherigen Ergebnisse gaben einen ersten Hinweis darauf, dass ADAM10 maßgeblich zur Freisetzung von sCD137 beiträgt. Um die Rolle von ADAM10 und ADAM17 in einem genetisch klar definierten System zu untersuchen und einen weiteren Nachweis für ADAM10 als Haupt-sheddase von CD137 zu bekommen wurden die Experimente aus 4.1.1. in einer weiteren

Zelllinie wiederholt. Hierzu wurden HEK293T Wildtyp (WT) und HEK293T-ADAM10/17-*Knock-Out* Zellen (dKO), welche weder ADAM10 noch ADAM17 exprimieren, verwendet.

Die erfolgreiche Transfektion des CD137-tGFP-Plasmids wurde ebenfalls wieder mit Hilfe von *Simple Western* (Abbildung 8A) und Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 8B) kontrolliert. Die Ladekontrolle mit Tubulin zeigte durch ein gleichmäßig starkes Signal, dass von allen Proben gleich viel Protein aufgetragen wurde. Zusammengerechnet liegt die Größe des tGFP plus CD137 bei ca. 54 kDa. Durch posttranslationale Modifikationen liegt die zu erwartende Bande allerdings bei ca. 66 kDa. Diese Bande ließ sich sowohl bei den WT- als auch bei den dKO-Zellen detektieren, nicht aber in der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 8A).

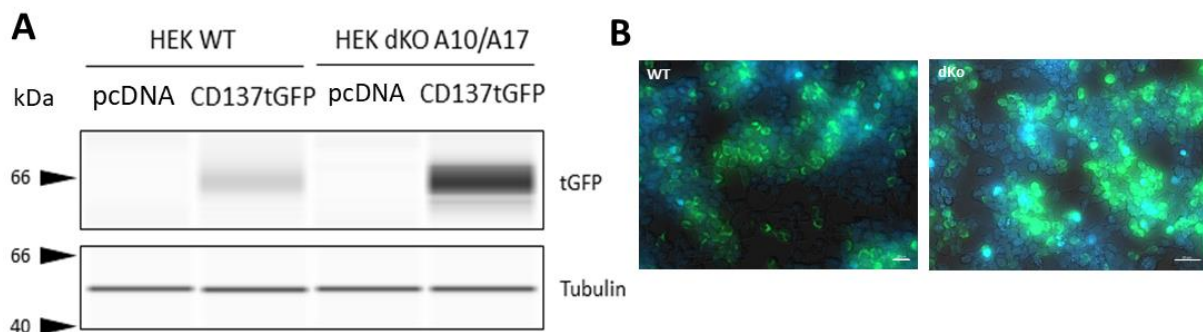


Abbildung 8: Transfektionskontrolle von HEK293T WT- und -dKO-Zellen. HEK293T WT- und -dKO-Zellen wurden mit CD137-tGFP transfiziert (48 h). **(A)** Mittels *Simple Western* erfolgte eine Transfektionskontrolle und das entsprechende Expressieren des CD137-tGFPs. Tubulin diente als Ladekontrolle. **(B)** Als weitere visuelle Transfektionskontrolle diente der Nachweis des Fluoreszenzsignals des tGFPs (grün). Die Zellkerne wurden hierbei mit dem Nukleinsäure-Farbstoff Hoechst 33342 (blau) gefärbt. Der Maßstab beträgt 20 µm. **(A, B)** Die dargestellten Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die erfolgreich transfizierten WT- und dKO-Zellen wurden anschließend in An- oder Abwesenheit des Breitband-Metalloprotease-Inhibitors MM sowie des ADAM10-Inhibitors GI und des ADAM10/17-Inhibitors GW inkubiert (Abbildung 9A). Es wurden die Überstände und die Lysate der WT- und dKO-Zellen im ELISA auf CD137 gemessen. Anschließend wurde prozentual berechnet wieviel der Gesamtmenge von CD137 in den Überstand abgegeben wurde. Dadurch konnte die x-fache Veränderung berechnet und auf den jeweiligen unbehandelten WT normiert. Die Behandlung der Zellen, sowohl mit Marimastat als auch mit GI und GW, führte in den WT-Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Sheddings von CD137 im Vergleich zur unbehandelten WT-Kontrolle. Die unbehandelten dKO-Zellen zeigten ebenfalls eine im Vergleich zu den unbehandelten WT-Zellen signifikante Reduktion des CD137-Sheddings. Wohingegen die dKO-Zellen, welche mit den Inhibitoren behandelt

wurden, keine Veränderung des CD137-Sheddings im Vergleich zur unbehandelten dKO-Kontrolle aufwiesen (Abbildung 9A).

Die Überprüfung eines induzierbaren CD137-Sheddings erfolgte mittels Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 durch IO bzw. Mel oder von ADAM17 durch PMA (Abbildung 8B). Erneut wurden hier die Überstände und Zelllysate beider Zelltypen im ELISA auf CD137 untersucht. Das Verhältnis der CD137-Menge im Überstand zu der Menge in den Lysaten wurde bestimmt und prozentual berechnet wieviel des gesamten CD137 in den Zellkultur-überstand freigesetzt wurde. Anschließend wurde damit die x-fache Veränderung berechnet, normiert auf die WT-Kontrolle. Die Stimulation durch IO führte nur in den WT-Zellen zu einer signifikanten Erhöhung der CD137-Freisetzung. Die unstimulierten dKO-Zellen zeigten eine konstitutiv geringere Freisetzung an CD137 im Vergleich zu der unstimulierten WT-Kontrolle. Zudem war die Stimulation in den HEK dKO-Zellen mit keinem der hier verwendeten Stimulanzen möglich (Abbildung 9B).

Zusätzlich zu den Inhibitor- und Stimulationsexperimenten wurde ein Retransfektions-experiment durchgeführt. Hierfür wurden die A10/A17-dKO-HEK-Zellen mit CD137-tGFP-Plasmid und mit pcDNA-, ADAM10- oder ADAM17-Plasmid transfiziert (Abbildung 9C). Sowohl die Überstände als auch Lysate transfizierter Zellen wurden im ELISA auf CD137 untersucht. Die Retransfektion der dKO-Zellen mit ADAM10 oder ADAM17 führte in beiden Fällen zu einer signifikanten Erhöhung der CD137-Freisetzung im Vergleich zur Transfektion der dKO-Zellen mit pcDNA. Dies bedeutet, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 in der Lage ist CD137 freizusetzen.

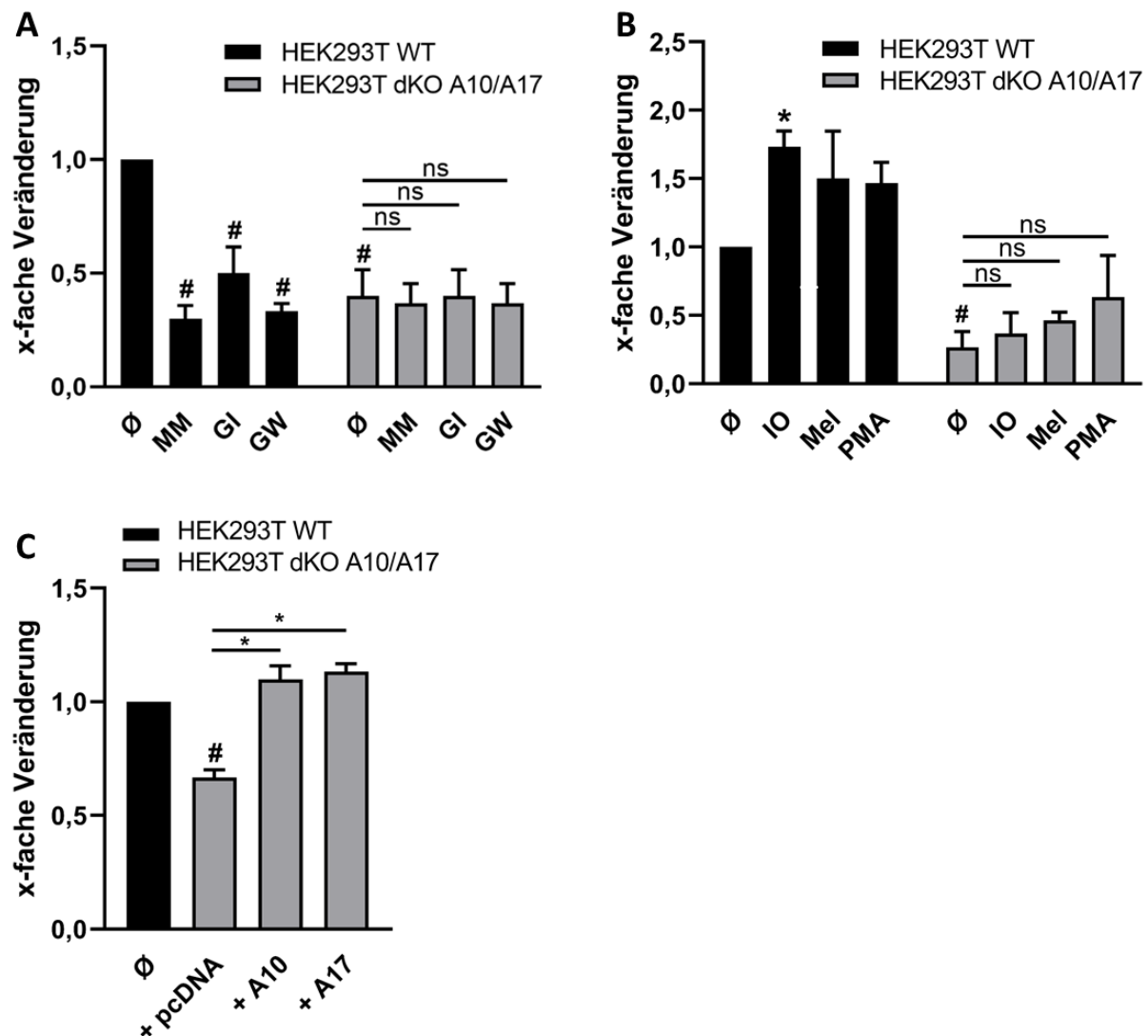


Abbildung 9: ADAM10 und -17 sind für die Freisetzung von CD137 in HEK293T WT verantwortlich. Die CD137-tGFP-transfizierten Zellen wurden auf die CD137-Menge im Überstand im Verhältnis zur Gesamtmenge CD137 im ELISA analysiert. Die x-fache Veränderung wurde normiert auf die unbehandelte WT-Kontrolle. **(A)** Die Inhibition mit GI (3 µM), GW (3 µM) oder MM (10 µM) erfolgte für 24 h. **(B)** Die Stimulation mit IO (1 µM) und Mel (1 µM) erfolgte für 30 min und die Stimulation mit PMA (200 ng/ml) für 2 h. **(C)** HEK293T dKO A10/A17-Zellen wurden mit CD137-tGFP und ADAM10, ADAM17 oder pcDNA kotransfiziert. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA **(C)** oder Two-Way-ANOVA **(A, B)** und des Post-Hoc-Tests nach Bonferroni analysiert. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die jeweilige unbehandelte WT-Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen unstimulierten WT-Kontrolle. ns steht für ein nicht signifikantes Verhältnis zur unstimulierten dKO-Kontrolle. (n=3; */# P < 0,05; MW ± SEM)

4.2 UNTERSUCHUNG VON CD137 IN PRIMÄREN HUMANEN T-ZELLEN

Alle bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse zur Untersuchung von sCD137 in T-Zellen gehen davon aus, dass es sich hierbei um *Splicing*-Varianten handelt (Shao et al., 2008). In den vorangegangenen Experimenten konnten jedoch gezeigt werden, dass sCD137 ein Produkt proteolytischen Sheddings durch ADAM10 und ADAM17 sein kann. So stellte sich

die zentrale Frage, ob sCD137 in aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ebenfalls durch ADAM10 und -17 freigesetzt wird. Da die CD137-Expression in T-Zellen strikt aktivierungsabhängig ist (Pollok *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994; Hurtado *et al.*, 1995;), sollten zunächst verschiedene Aktivierungen für eine möglichst hohe CD137-Expression untersucht werden.

4.2.1 ANALYSE VERSCHIEDENER STIMULANZIEN ZUR EXPRESSION VON CD137 AUF T-ZELLEN

Die Expression von CD137 in T-Zellen ist durch verschiedene Stimuli aktivierbar. Um die bestmögliche Aktivierung bzw. die höchstmögliche Expression von CD137 zu finden wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit CD3-/CD28-Antikörper, PMA/IO oder Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) aktiviert. Die Aktivierung von T-Zellen erfordert zwei Signale, eines vom T-Zell-Rezeptor-Komplex, welches durch CD3 ausgelöst wird, und das Zweite durch eine Interaktion von kostimulierenden Rezeptoren wie CD28 (Sykulev *et al.*, 1996; Alegre *et al.*, 2001).

PMA hingegen aktiviert die Proteinkinase C, während IO für einen Kalziuminflux in die Zelle sorgt. Dies führt zur Aktivierung mehrerer intrazellulärer Signalwege, die so den T-Zell-Rezeptor-Komplex umgehen und trotzdem zur Aktivierung der Zelle führen (Ai *et al.*, 2013). SEB ist ein bakterielles Superantigen, welches sowohl an den T-Zell-Rezeptor-Komplex bindet als auch als kostimulierendes Molekül wirkt (Whitfield *et al.*, 2017).

CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden im folgenden Experiment mit CD3/CD28-Antikörper (je 1 µg/ml), PMA (200 ng/ml)/IO (1 µg/ml) oder SEB (1 µg/ml) inkubiert und im Durchflusszytometer auf die Menge von CD137 auf der Oberfläche der Zellen analysiert. Nach der Messung der magnetisch angereicherten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen wurden zur Auswertung die Zielpopulationen durch die Erstellung sequentieller Analysefenster („Gates“) definiert. Hierbei wurden jeweils nacheinander Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zellen und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen markiert (Abbildung 10A, 10C). Anschließend wurden die jeweiligen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen auf ihre unterschiedliche Oberflächenexpression mittels spezifischem FITC-gekoppelten CD137-AK überprüft, auf die jeweilige Zellzahl normalisiert (*normalize to mode*) und miteinander verglichen (Abbildung 10B, 10D). Ebenfalls wurden die Zellkulturüberstände mittels CD137-ELISA untersucht (Abbildung 11).

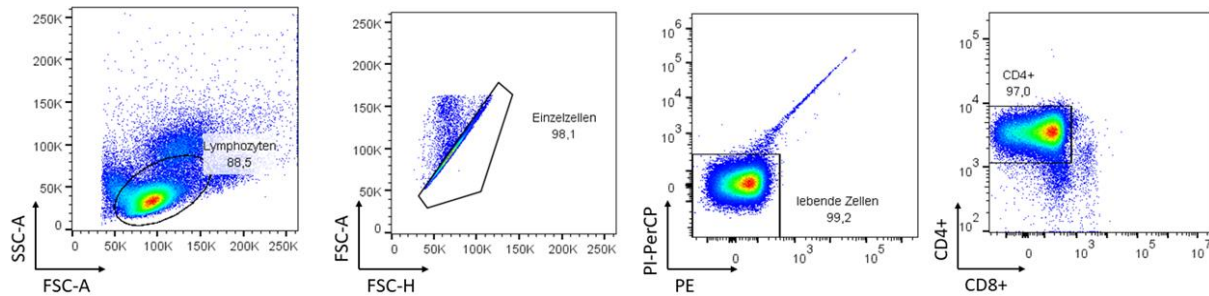
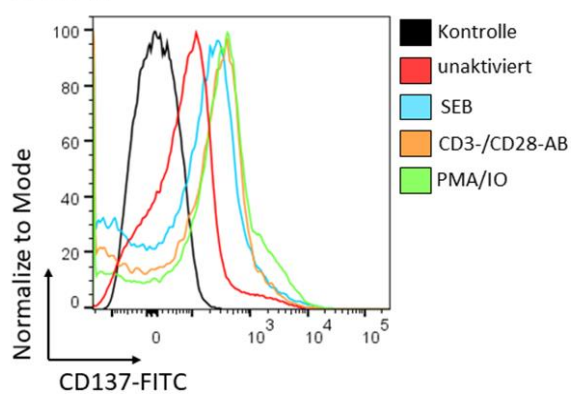
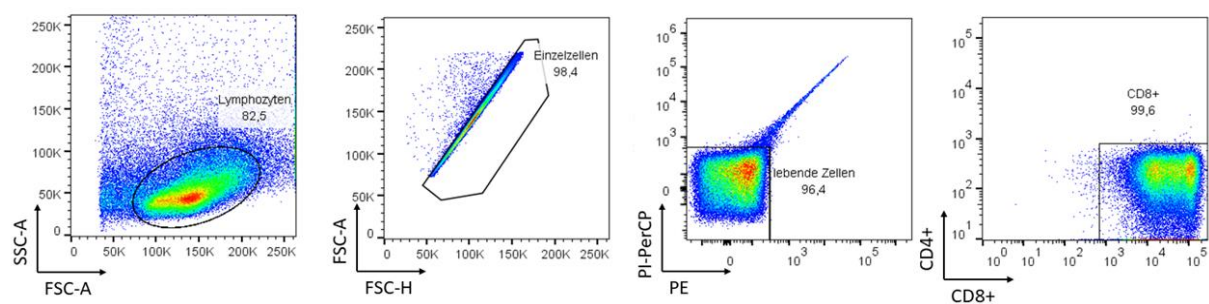
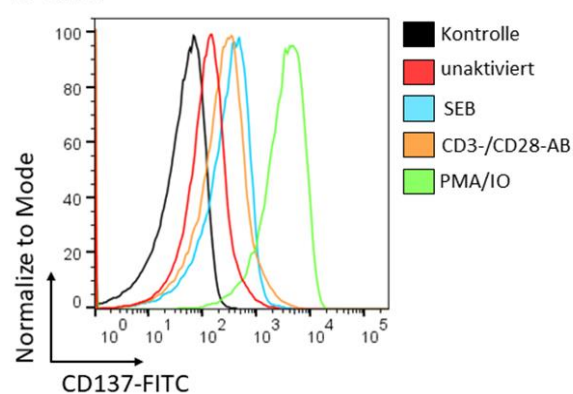
A CD4+**B CD4+****C CD8+****D CD8+**

Abbildung 10: Oberflächenexpression von CD137 auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung. Durchflusszytometrie-Analyse von magnetisch angereicherten CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung mit CD3/CD28-Antikörper (je 1 µg/ml), PMA (200 ng/ml)/IO (1 µg/ml) oder SEB (1 µg/ml) für 24 h, im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle. Die dargestellte Gatingstrategie ist repräsentativ für alle unaktivierten und aktivierten Zellen. **(A, C)** Nach der Messung wurden zur Auswertung sequentiell Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zellen und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen definiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil des jeweiligen Analysefensters („Gates“). **(B, D)** Diese CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden weiterhin auf ihre Expression von CD137 untersucht und miteinander verglichen. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden mit CD3-/CD28-Antikörper, PMA/IO oder SEB über 24 h aktiviert, anschließend mit CD137-FITC angefärbt und im Durchflusszytometer im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle untersucht (Abbildung 10). Nach Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen mit SEB zeigte sich eine Verstärkung der Expression von CD137 auf der Oberfläche der Zellen im Vergleich zur unaktivierten Kontrolle. Die Oberflächenexpression von CD137 war im Vergleich zu SEB bei den CD4⁺ T-Zellen, welche mit CD3-/CD28-Antikörper oder PMA/IO stimuliert wurden, sogar noch stärker (Abbildung 10B). Bei den CD8⁺ T-Zellen führte ebenfalls jede Behandlung zu einer vermehrten Expression von CD137 auf der Zelloberfläche. Nach Aktivierung mit SEB oder PMA/IO ist auf der Oberfläche der CD8⁺ T-Zellen ähnlich viel CD137 nachzuweisen. Bei Behandlung der Zellen mit CD3-/CD28-Antikörper ist die Expression von CD137 in CD8⁺ T-Zellen am stärksten (Abbildung 10D).

Zusätzlich zur Durchflusszytometrie wurden die Zellkulturüberstände der un- bzw. aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im ELISA auf sCD137 überprüft (Abbildung 11).

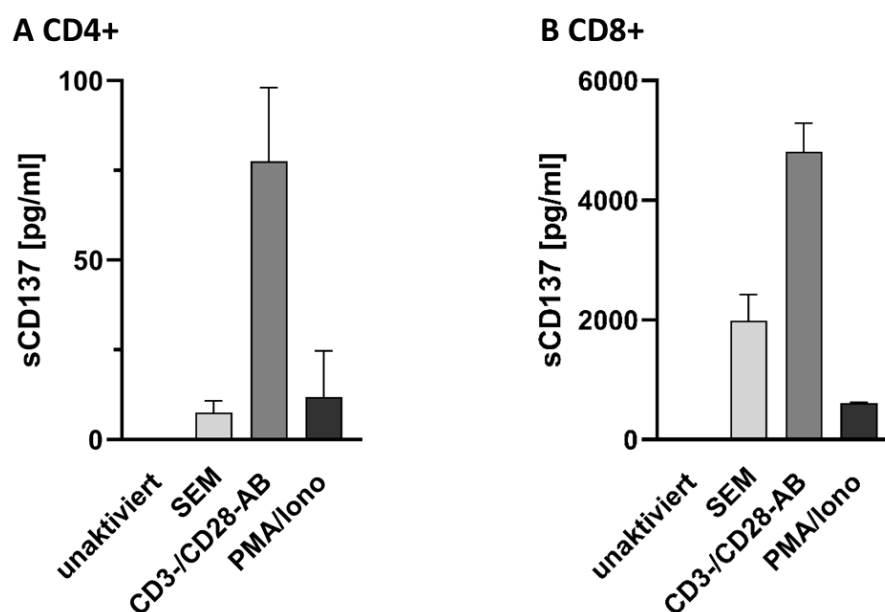


Abbildung 11: sCD137 in Zellkulturüberständen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Aktivierung. sCD137 [pg/ml] in Überständen von CD4⁺ (A) oder CD8⁺ (B) T-Zellen nach Aktivierung mit CD3-/CD28-Antikörper (je 1 µg/ml), PMA (200 ng/ml)/IO (1 µg/ml) oder SEB (1 µg/ml) für 24 h, im Vergleich zur unaktivierten Kontrolle. (n=2; MW ± SEM)

Es konnte kein sCD137 in den Überständen unaktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Alle getesteten Aktivatoren führten zu einer Freisetzung von sCD137. Jedoch führte sowohl in den CD4⁺ als auch den CD8⁺ T-Zellen die Aktivierung mit SEB oder PMA/IO zu einer deutlich geringeren Menge an sCD137 in den Zellkulturüberständen im Vergleich zur Aktivierung mit CD3-/CD28-Antikörpern (Abbildung 11).

Sowohl die Analyse der Oberflächenexpression von CD137 als auch die detektierte Menge sCD137 in den Überständen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigte, dass die beste Aktivierung mit CD3-/CD28-Antikörper erreicht wurde, weshalb in allen folgenden Experimenten die T-Zellen ausschließlich mit CD3-/CD28-Antikörper aktiviert wurden.

4.2.2 ADAM-INHIBITOREN FÜHREN ZUR REDUKTION VON sCD137 IM ÜBERSTAND VON T-ZELLEN

Die Untersuchungen von HT29- und HEK293T-Zellen mit dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor MM, dem ADAM10-Inhibitor GI und dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW zeigten, dass es sich bei dem sCD137 nicht wie angenommen um eine *Splicing*-Variante, sondern um ein Sheddingprodukt einer Metalloprotease, vornehmlich ADAM10, handelt. Da bislang angenommen wurde, dass es sich bei sCD137 in T-Zellen um eine *Splicing*-Variante handelt, wurden aktivierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen über einen Zeitraum von bis zu 96 h mit MM (10 μ M), GI (3 μ M) oder GW (3 μ M) inkubiert und die Menge an sCD137 im Überstand der Zellen mittels ELISA detektiert (Abbildung 12).

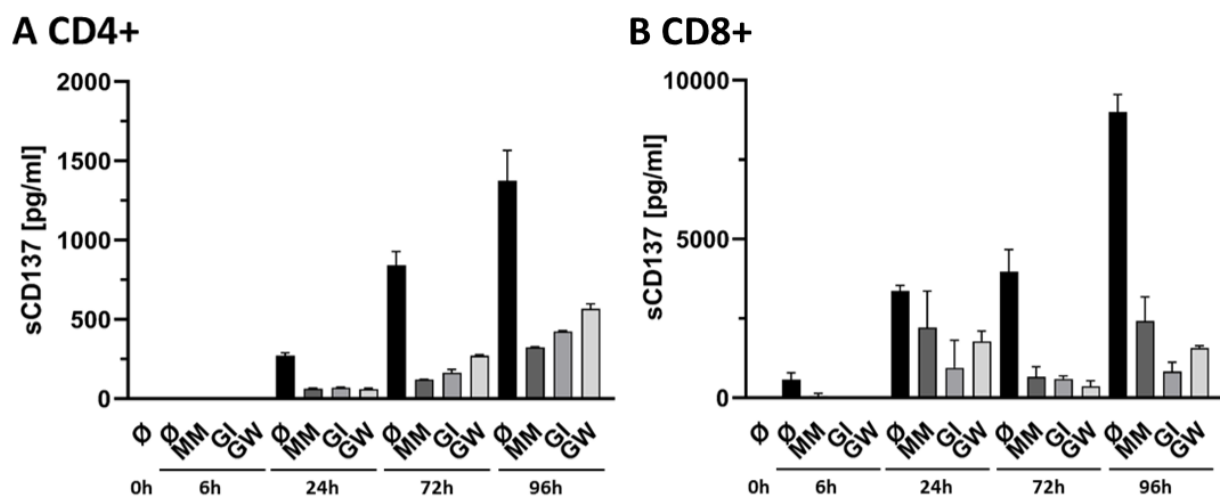


Abbildung 12: ADAM10 ist die Hauptsheddase von endogen exprimiertem CD137 in T-Zellen. (A) Aktivierete CD4⁺ oder (B) CD8⁺ T-Zellen wurden für 6 h, 24 h, 72 h oder 96 h mit dem ADAM10-Inhibitor GI (3 μ M), dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW (3 μ M) oder dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM, 10 μ M) inkubiert. Die Überstände wurden anschließend mittels ELISA auf sCD137 überprüft. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für fünf Versuche. (MW \pm SD)

sCD137 konnte in CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 12B) erstmal nach 6 h und in CD4⁺ T-Zellen (Abbildung 12A) nach 24 h detektiert werden. In beiden Zelltypen kam es zu einer Zunahme der Menge an sCD137 in den Überständen der unbehandelten Kontrollgruppen über die Zeit. Außerdem wurde deutlich, dass CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den CD4⁺ T-Zellen mehr CD137 exprimieren. Die Zugabe aller drei Inhibitoren führte in beiden Zelltypen zu einer starken

Reduktion des sCD137 in den Überständen. Bei den CD4⁺ T-Zellen hatte MM über die gesamte Zeit den stärksten Effekt, GW den schwächsten. Bei den CD8⁺ T-Zellen zeigte sich nach 72 h die stärkste Reduktion von sCD137 durch die Inhibitoren. Hier hatte allerdings GW einen leicht stärkeren Effekt als MM und GI.

Die Ergebnisse dieses Inhibitionsexperiments zeigen, dass CD137 auch in T-Zellen proteolytisch durch ADAM10 und ADAM17 abgespaltet werden kann.

4.2.3 ZUGABE VON ADAM-INHIBITOREN FÜHRT ZUR AKKUMULATION VON CD137 AUF DER OBERFLÄCHE

Um die Aussage, dass ADAM10 und ADAM17, anders als bislang angenommen, maßgeblich am Shedding von CD137 in T-Zellen beteiligt sind zu festigen, sollten nicht nur die Überstände der Zellen auf sCD137, sondern auch die Oberflächenexpression von CD137 auf eine mögliche Akkumulation nach Zugabe der Inhibitoren untersucht werden.

Hierfür wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ebenfalls wieder mit den Inhibitoren MM (10 µM), GI (3 µM) und GW (3 µM) inkubiert und nach 72 h im Durchflusszytometer auf die Menge von CD137 auf der Oberfläche untersucht. Magnetisch angereicherte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden gemessen und anschließend nacheinander auf Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zellen und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen gated (Abbildung 13A, 13C). Die Oberflächenexpression wurde schlussendlich für die jeweiligen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen überprüft, auf die jeweilige Zellzahl normalisiert (*normalize to mode*) und miteinander verglichen. Als Kontrolle dienten ungefärbte Zellen (Abbildung 13B, 13D).

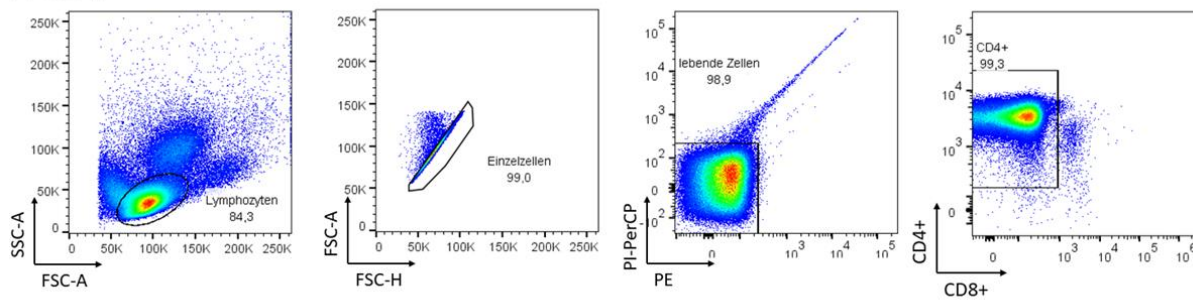
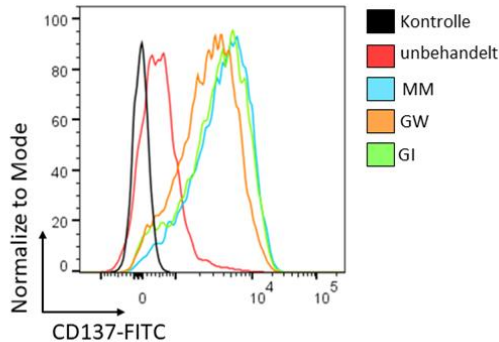
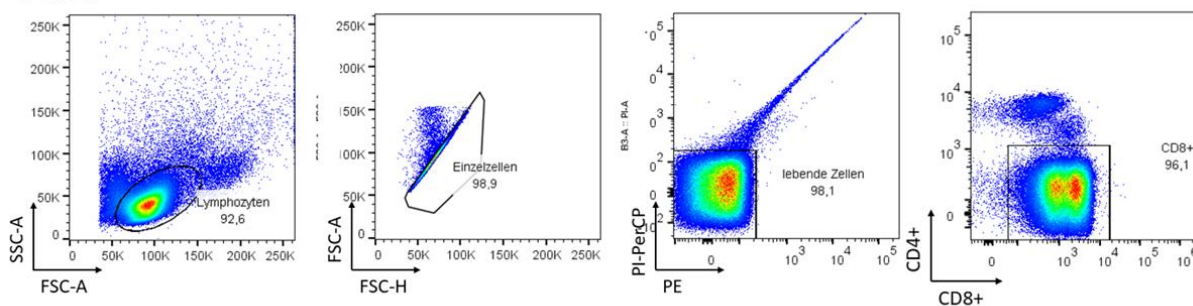
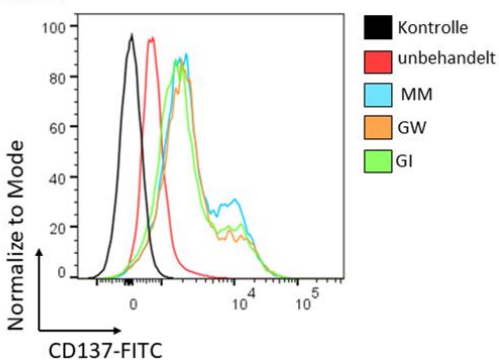
A CD4⁺**B CD4⁺****C CD8⁺****D CD8⁺**

Abbildung 13: CD137-Oberflächenexpression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Inkubation mit Inhibitoren. Durchflusszytometrische-Analyse von magnetisch angereicherten CD4⁺ (A,B) und CD8⁺ (C,D) T-Zellen nach Aktivierung und Inkubation mit dem ADAM10-Inhibitor GI (3 μ M), dem ADAM10/ADAM17-Inhibitor GW (3 μ M), dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM, 10 μ M) und der unbehandelten Kontrolle für 72 h im Vergleich zur ungefärbten Kontrolle. Die dargestellte Gatingstrategie ist repräsentativ für alle unaktivierten und aktivierten Zellen. (A, C) Nach der Messung wurden zur Auswertung sequentiell Lymphozyten, Einzelzellen, lebende Zellen und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen definiert. Angegeben ist der prozentuale Anteil des jeweiligen Analysefensters („Gates“). (B, D) Diese CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden weiterhin auf ihre Expression von CD137 untersucht und miteinander verglichen. Das dargestellte Experiment ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Nach magnetischer Anreicherung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte die Analyse der Oberflächenexpression von CD137 mittels Durchflusszytometrie. Die Ergebnisse zeigten auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen von CD137 auf der Zelloberfläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Anreicherung von CD137. Jedoch zeigte GW hier einen etwas schwächeren Effekt als MM und GI (Abbildung 13B). Bei den CD8⁺ T-Zellen führten ebenfalls alle Inhibitoren zu einer Akkumulation von CD137 auf der Zelloberfläche im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 13D).

Die Zugabe der ADAM-Inhibitoren MM, GI und GW führte sowohl in den Überständen der T-Zellen zu einer Abnahme an sCD137 als auch zu einer Zunahme von CD137 auf der Oberfläche der behandelten Zellen. Bislang wurde angenommen, dass es sich bei sCD137 in T-Zellen um eine *Splicing*-Variante handelt. Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass ADAM10 und -17 nicht nur die Hauptsheddasen von CD137 in transfizierten HT29 und HEK293T Zellen sind, sondern auch in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und sCD137 somit ein Produkt proteolytischen Sheddings mindestens einer Metalloprotease ist.

4.3 PHYSIOLOGISCHE RELEVANZ DES CD137-SHEDDINGS

Das CD137-/CD137-Ligand-Paar besitzt, wie einige andere Rezeptor-/Ligand-Paare in der TNFR/TNF-Superfamilie, die Fähigkeit zur bidirektionalen Signalübertragung (Eissner *et al.*, 2004). Dies bedeutet, dass eine Signalübertragung sowohl über den CD137-Rezeptor als auch durch den Liganden möglich ist. Anders als CD137, welches auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wird der CD137-Ligand in erster Linie auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Die Bindung des Liganden führt z.B. zu einer Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder IL-8 und einer Vielzahl anderer Immunantworten (Langstein *et al.*, 1998; Schwarz, 2005). sCD137 hat ebenso wie seine membranständige Form (mCD137) die Fähigkeit den Liganden zu binden (Shao *et al.*, 2008). Bisher wird davon ausgegangen, dass sCD137 die Wechselwirkung des mCD137 mit seinem CD137-Liganden stören könnte und so die Aktivität des CD137-/CD137-Ligandensystems hemmt.

Da das Shedding von ADAM10-Substraten immer in der Nähe der *Stalk*-Region des jeweiligen Substrats erfolgt, kann davon ausgegangen werden, dass gesheddetes sCD137 seine extrazelluläre Domäne beinhaltet und somit die Fähigkeit an seinen Liganden zu binden beibehält.

Der folgende Versuch sollte Klarheit darüber bringen ob auch gesheddetes sCD137 eine Wirkung auf den CD137-Liganden haben würde.

4.3.1 FUNKTIONELLE ANALYSE DES CD137/CD137-LIGAND-SYSTEMS

Um die Bedeutung von gesheddetem sCD137 in der CD137-/CD137-Liganden-Interaktion zu untersuchen, wurden zunächst Zellen benötigt, welche den CD137-Liganden exprimieren. Der CD137-Ligand wird u.a. auf APCs, Monozyten und Makrophagen exprimiert, weshalb die monozytären Zelllinien HL60- und THP1-Zellen daraufhin untersucht wurden. Lysate von mit PMA (100 ng/ml) über 24 h aktivierte und unaktivierte THP1- und HL60-Zellen wurden im *Western Blot* mit Hilfe eines gegen den CD137-Liganden gerichteten Antikörpers untersucht. PMA diene hierbei als Stimulator für die Differenzierung der Zellen. Mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) wurde zusätzlich eine Quantifizierung der mRNA-Expression des Liganden durchgeführt. Als Kontrolle dienten hierbei HEK293T-Zellen. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode ausgewertet (*housekeeping gene: hhpert*) und mit HEK293T WT-Zellen als Kontrolle ins Verhältnis gesetzt.

Die Analyse der THP1- und HL60-Zellen mittels *Western Blot* zeigte mit Hilfe von Actin als Ladekontrolle in allen Proben ein ähnlich starkes Signal. Dies wies daraufhin, dass von allen Proben in etwa gleich viel Protein aufgetragen wurde. Das errechnete Molekulargewicht des CD137-Liganden liegt bei ca. 26 kDa. Allerdings kann es durch posttranslationale Modifikationen auch deutlich größer sein. Der *Western Blot* zeigte sowohl in unaktivierten als auch mit PMA aktivierten Zellen jeweils Banden bei ca. 34 und 55 kDa (Abbildung 14A). Da hier nicht eindeutig gesagt werden konnte, welche die spezifische Bande war, wurden die Zellen zusätzlich mittels qPCR auf ihre CD137-Ligandenexpression untersucht. Die qPCR zeigte in beiden Zelltypen eine fast 7-fach stärkere Expression des Liganden in HL60- und THP1-Zellen als in HEK293T. Diese Experimente zeigten also, dass HL60- und THP1-Zellen den Liganden exprimieren und sich für die folgenden Versuche eignen (Abbildung 14B).

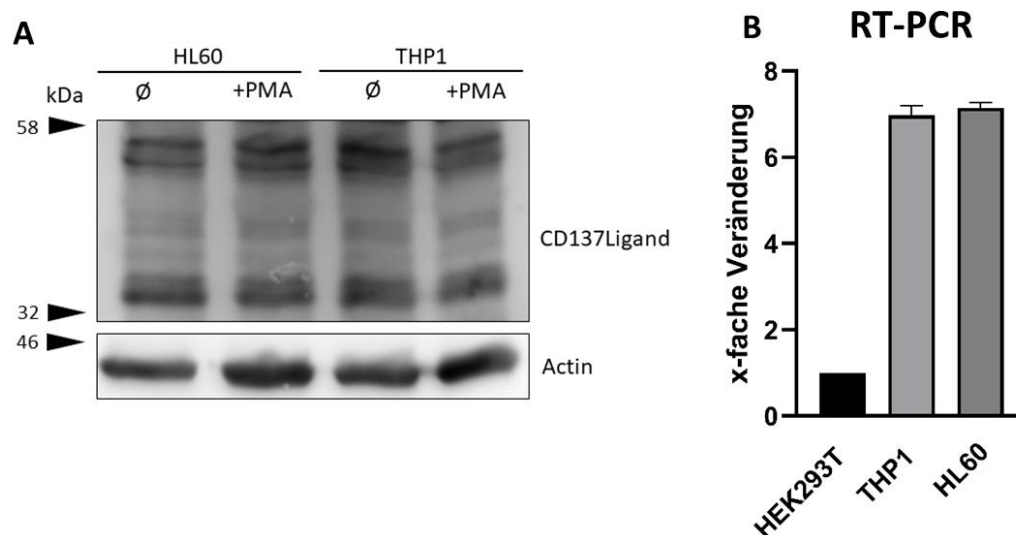
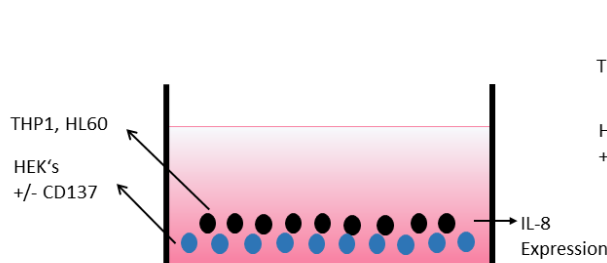


Abbildung 14: CD137-Liganden-Expression in HL60- und THP1-Zellen. HL60- und THP1-Zellen wurden mittels *Western Blot* (A) und quantitativer Real-Time PCR (B) auf ihre CD137-Liganden-Expression untersucht. (A) Mit PMA (100 ng/ml) über 24 h aktivierte und unaktivierte HL60- und THP1-Zellen wurden im *Western Blot* auf das Expressieren des CD137-Liganden untersucht. Actin diente als Ladekontrolle. (B) mRNA-Expression des CD137-Liganden in HEK293T-, THP1- und HL60-Zellen. Die Ergebnisse wurden mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode ausgewertet (*housekeeping gene*: *hprt*) und mit der Kontrolle (HEK293T) ins Verhältnis gesetzt. (A) Die dargestellten Experimente sind stellvertretend für drei unabhängige durchgeführte Versuche. (B) (n=3; MW \pm SEM)

Die Bindung des CD137-Liganden durch CD137 induziert auf Seite der APCs eine Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. IL-8 (Langstein *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob die Freisetzung von IL-8 nur durch mCD137 oder auch durch gesheddetes sCD137 induziert wird, sollten THP1- oder HL60-Zellen sowohl direkt als auch indirekt mit CD137-transfizierten HEK-Zellen inkubiert werden (Abbildung 15). Bei der direkten Kokultur wurden die Zellen zusammen in einem Well inkubiert. Bei der indirekten Kokultur wird davon ausgegangen, dass die CD137-transfizierten HEK-Zellen CD137 konstitutiv von der Oberfläche shedden und dieses somit als sCD137 in den Überstand geht und so möglicherweise an seinen Liganden auf den THP1- bzw. HL60-Zellen binden kann.

A direkte Ko-Kultur



B indirekte Ko-Kultur über Transwell

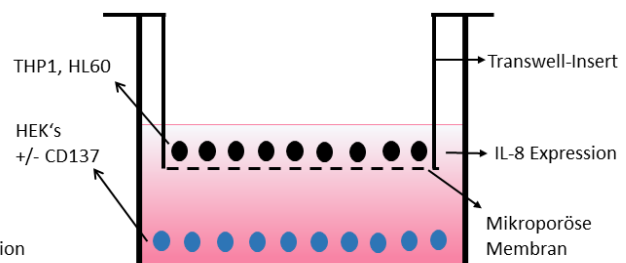


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Kokultivierung von aktivierten THP1- oder HL60-Zellen mit CD137-transfizierten HEK- Zellen. (A) THP1- bzw. HL60-Zellen wurden direkt mit CD137-transfizierten HEKs in einem Well kultiviert. (B) Indirekte Kokultivierung von THP1 bzw. HL60 mit CD137-transfizierten HEKs. THP1- bzw. HL60-Zellen wurden hier in einem Transwell mit einer mikroporösen Membran kultiviert. Die Membran ist nur durchlässig für kleine Moleküle, nicht aber für die Zellen.

Die indirekte Kokultivierung erfolgte hier mittels Transwell-Inserts, welche mit einer mikroporösen Membran ausgekleidet sind, durch die lediglich kleine Moleküle, nicht aber die verwendeten Zellen passen. THP1- oder HL60-Zellen wurden hierfür mit PMA (100 ng/ml) über 24 h aktiviert. Anschließend wurden die aktivierten Zellen für 72 h mit pcDNA- oder CD137-transfizierten HEK-Zellen direkt oder indirekt kokultiviert. Die IL-8-Detektion im Überstand der Zellen erfolgte Mittels ELISA (Abbildung 16).

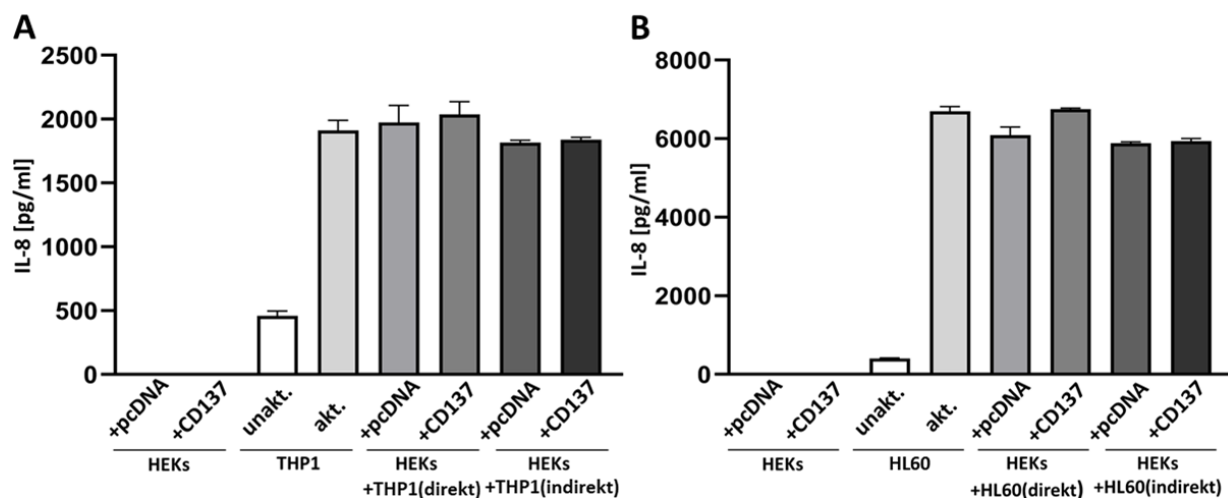


Abbildung 16: IL8-Freisetzung von THP1- bzw. HL60-Zellen nach Kokultivierung mit CD137-transfizierten HEK-Zellen. (A) THP1- oder (B) HL60-Zellen wurden für 24 h mit PMA (100 ng/ml) aktiviert und direkt oder indirekt in Transwells mit pcDNA- oder CD137-transfizierten HEK-Zellen für 72 h inkubiert. Anschließend wurde die IL-8-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Als Kontrollen wurde sowohl die IL-8-Freisetzung von HEK-Zellen, als auch von THP1- und HL60-Zellen, welche alleine kultiviert waren, gemessen. (n=2; MW \pm SD)

Sowohl mit pcDNA- oder CD137-transfizierte HEK-Zellen, als auch unaktivierte THP1- und HL60- Zellen exprimieren kein IL-8. Durch die Zugabe von PMA lässt sich sowohl bei den THP1- als auch bei den HL60-Zellen, die IL-8-Freisetzung induzieren. Bei direkter Kokultivierung mit den HEK-Zellen kommt es jedoch zu keiner Veränderung der IL-8-Produktion im Vergleich zu den alleinkultivierten aktivierten HL60- oder THP1-Zellen. Des Weiteren gab es nur einen geringfügigen Unterschied zwischen THP1-/HL60-Zellen, welche mit pcDNA- oder CD137-transfizierten Zellen kultiviert wurden. Bei indirekter Kokultivierung der Zellen in den Transwells gab es keinerlei Unterschiede in der IL-8-Produktion bei Kultivierung mit pcDNA- oder CD137-transfizierten HEKs. Die Zellen der indirekten Kokultur wiesen eine geringfügig niedrigere IL-8-Freisetzung auf als die Zellen der direkten Kokultur. Dieser Unterschied war allerdings marginal (Abbildung 16).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Transfektion der HEK-Zellen mit CD137 keinen Unterschied auf die IL-8-Produktion der THP1- bzw. HL60-Zellen hatte. Des Weiteren lassen sich keine Rückschlüsse darauf ziehen, ob die IL-8-Freisetzung durch mCD137 oder sCD137 induziert werden kann. Möglicherweise führten in der Kokultur weitere Moleküle zur Beeinflussung der Zellen, so dass es zu keiner Veränderung der IL-8-Freisetzung kam. Abschließend lässt sich feststellen, dass dieses System nicht geeignet ist eine Aussage über die Funktion von sCD137 zu treffen.

4.3.2 GESHEDDETES sCD137 BEEINFLUSST PROLIFERATION VON T-ZELLEN

Im vorangegangenen Experiment konnte auf Seiten der APCs keine Veränderung der IL-8-Freisetzung nach direkter oder indirekter Kokultur gezeigt werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass durch die Aktivierung der HL60- und THP1-Zellen mit PMA die IL-8-Expression bereits weitestgehend hochreguliert wurde. Zum anderen könnte das sich noch im Medium befindliche PMA eine Auswirkung auf die HEK-Zellen haben.

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass nicht nur APCs sondern auch aktivierte T-Zellen den CD137-Liganden exprimieren (Goodwin *et al.*, 1993; Pollok *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994). Die Auswirkung für die Zelle bei Bindung des Liganden ist jedoch bisher nicht näher untersucht worden. Um einen möglichen Effekt von gesheddetem sCD137 bei Bindung seines Liganden auf die T-Zelle zu untersuchen, sollten Überstände von CD137-transfizierten HEK-Zellen auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gegeben und die Proliferation gemessen werden.

Kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen externalisiertem Phosphatidylserin (PS) mit ADAM10 und -17 notwendig ist, damit die Proteasen ihre Sheddingfunktion aufnehmen können (Sommer *et al.*, 2016; Bleibaum *et al.*, 2019; Veit *et al.*, 2019). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Externalisierung von PS durch Scramblasen wie Anoctamin-6 (ANO6) induziert wird. ANO6 wird mit Hilfe eines Kalzium-Stimulus wie IO aktiviert und führt so zu einer schnellen Translokation von PS auf die externe Seite der Membran, wodurch wiederum ADAM10 und -17 aktiviert werden (Veit *et al.*, 2018).

Sinje Leitzke, Doktorandin in unserer Arbeitsgruppe, führte Transfektionsexperimente mit einer ANO6-hyperaktiven Mutante (ANO6H) durch. Diese Mutante ist überempfindlich gegenüber Kalzium, wodurch es zu einer andauernden Scramblaseaktivität kommt und ununterbrochen PS externalisiert wird, was wiederum zu einer anhaltenden ADAM-

Sheddingaktivität führt. Sie konnte zeigen, dass hyperaktives ANO6 in HT29- und HEK-Zellen zu einer massiven Freisetzung von sCD137 führte, ohne dass ein Stimulus notwendig gewesen ist (Abbildung 17).

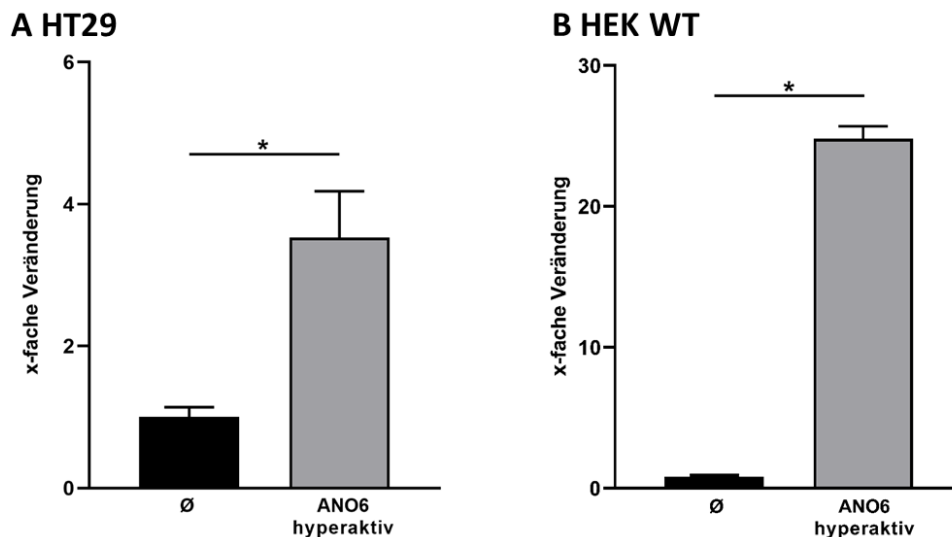


Abbildung 17: Hyperaktives Anoctamin-6 (ANO6H) führt zum Shedding von CD137 in HT29- und HEK293T-Zellen. ANO6H- und pcDNA-transfizierte **(A)** HT29-Zellen oder **(B)** HEK293T-WT-Zellen wurden 30 min lang mit Ionomycin (IO; 1 μ M) stimuliert. Die Zellen wurden auf die relative Menge der Sheddingprodukte im Überstand im Verhältnis zur Gesamtmenge CD137 im ELISA analysiert. Die x-fache Veränderung wurde normiert auf die mock-Kontrolle. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Holm-Sidak analysiert. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die jeweils unbehandelte Kontrolle. **((A) n=5; (B) n=3; * P < 0,05; MW \pm SEM)** Die Daten wurden von Sinje Leitzke generiert und zum Verständnis des nachfolgenden Versuchs integriert.

Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von CD137 und CD137-Ligand in aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mittels semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen. Nach erfolgter RT-PCR wurden die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen. *HPRT1* diente hier als Kontrolle. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen exprimieren CD137 als auch den CD137-Liganden (Abbildung 18).

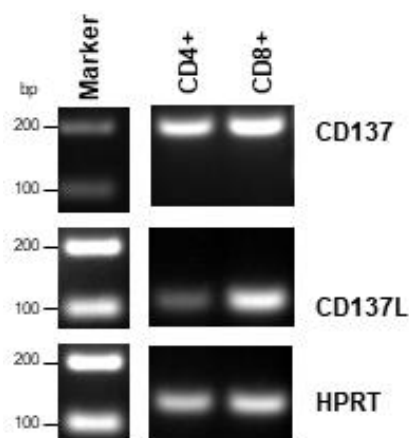


Abbildung 18: mRNA-Expression von CD137 und CD137-Ligand in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Repräsentative Agarosegelbilder, die die mRNA-Expression von CD137 und CD137-Ligand (CD137L) in aktivierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigen. Das Housekeeping-Gen *HPRT* diente als Kontrolle.

Diese Experimente waren wichtig, da im folgenden Versuch der Effekt von sheddetem sCD137 ohne das Transferieren des zuvor gegebenen Stimulus auf die zu behandelnden Zellen auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht werden sollte. Hierzu wurden zunächst HEK293T-Zellen mit pcDNA, ANO6H oder CD137/ANO6H transfiziert. Die Überstände wurden nach 24 h gewechselt und über weitere 24 h gesammelt, anschließend abgenommen und in neue Platten, welche eine hohe Affinität für Proteine besitzen, überführt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Überstände abgenommen und CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf die Platten gegeben (Abbildung 19).

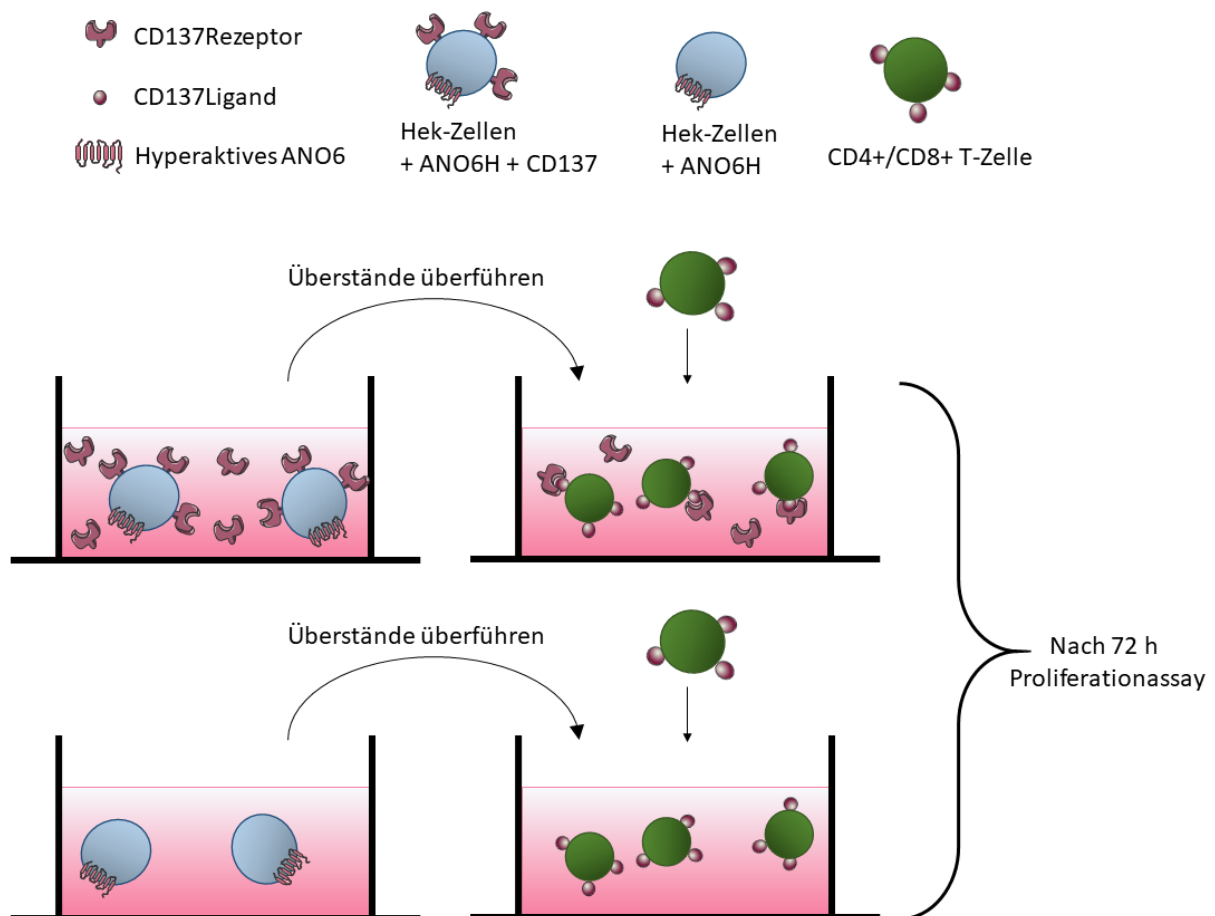


Abbildung 19: Schematische Darstellung des Proliferationsassays. HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA, CD137/ANO6H oder ANO6H über 24 h transfiziert. Das Medium wurde gewechselt, über 24 h gesammelt und auf Platten mit einer hohen Affinität für Proteine gecoated. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wurde das Medium, mit noch vermeintlich löslichem Rezeptor, gewechselt und CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf die Platte gegeben. Nach 72 h wurde ein Proliferationsassay der Zellen durchgeführt.

Nach 72 h Inkubation wurde die Proliferation der T-Zellen mit Hilfe eines Luziferase-Assays bestimmt. Hierbei dient die Messung des Adenosintriphosphats (ATPs) als Indikator für den Zellstoffwechsel (Abbildung 20).

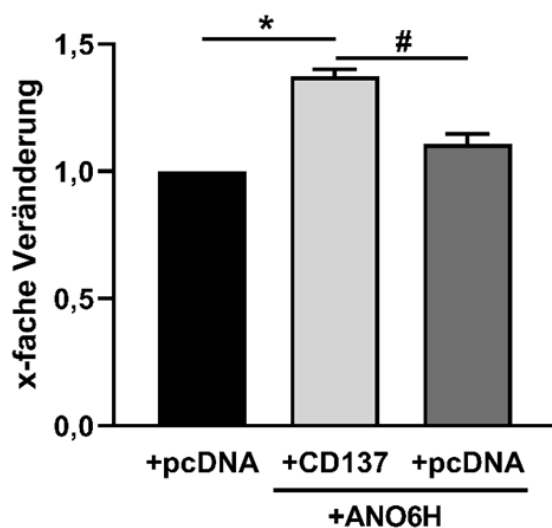
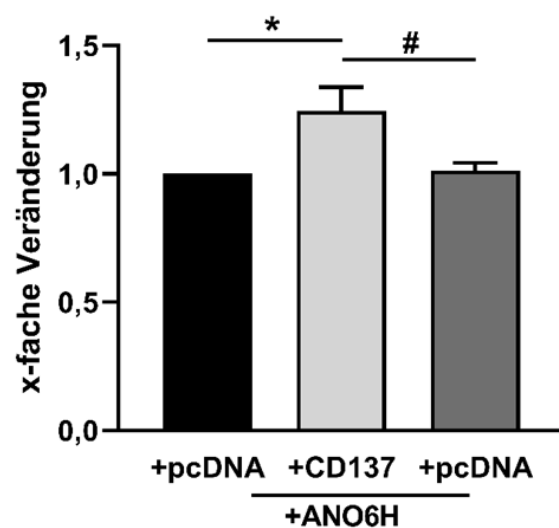
A CD4+**B CD8+**

Abbildung 20: Gesheddetes sCD137 erhöht die Proliferation in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Proliferationsassay von (A) CD4⁺ und (B) CD8⁺ T-Zellen. HEK293T-Zellen wurden entweder mit pcDNA, CD137/ANO6H oder ANO6H transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium gewechselt und über weitere 24 h gesammelt. Das gesammelte Medium wurde auf hochbindende 96-Well-Platten geschichtet, für 30 min inkubiert und anschließend abgenommen. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden auf die Platten gegeben und über 72 h kultiviert. Ihre Proliferation wurde gemessen und die x-fache Veränderung im Vergleich zur pcDNA-Kontrolle normiert. Die Daten wurden mittels One-Way-ANOVA und des Post-Hoc-Tests nach Sidak analysiert. * steht für einen signifikanten Anstieg in Bezug auf die jeweilige mock-Kontrolle, # steht für eine signifikante Reduktion in Bezug zur jeweiligen mock-Kontrolle. (n=4; * / # P < 0,05; MW ± SEM)

Nach Zugabe der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf die Platten, welche zuvor mit dem Überstand von CD137/ANO6H-transfizierten HEK inkubiert wurden, stieg die Proliferation der Zellen signifikant an im Vergleich zu den Platten, welche mit pcDNA-transfizierten HEK-Überständen vor inkubiert wurden. ANO6H-transfizierte HEK-Überstände allein hatten keinen Einfluss auf die Proliferation der T-Zellen und führten zu einer signifikanten Reduktion im Vergleich der Zellen, welche mit den CD137/ANO6H-Überständen inkubiert wurden (Abbildung 20).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass gesheddetes sCD137 die Proliferation von T-Zellen signifikant erhöht. Diese Daten deuten darauf hin, dass gesheddetes sCD137 funktionell aktiv ist, seinen Liganden binden und so eine Zellantwort auslösen kann.

4.4 NACHWEIS VON sCD137 IN SEREN VON AUTOIMMUNERKRANKTEN PATIENTEN

Derzeit gibt es gegensätzliche Studien über die Menge an sCD137 im Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen. So weisen beispielsweise Patienten mit Typ-1-Diabetes einen deutlich geringeren Serumspiegel und Patienten mit rheumatoider Arthritis einen deutlich höheren Gehalt an sCD137 im Serum im Vergleich zu gesunden Menschen auf (Michel *et al.*,

1998; Itoh *et al.*, 2019). Außerdem wird angenommen, dass CD137 in Autoimmunerkrankungen wie Psoriasis (Cheuk *et al.*, 2014) und entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (Maerten *et al.*, 2006) eine Rolle in der negativen Rückkopplungsregulation der Immunantworten spielt (DeBenedette *et al.*, 1995).

Um zu überprüfen, ob sCD137 in der Pathophysiologie von Autoimmunerkrankungen wichtig ist, wurden Seren von Patienten mit Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im ELISA auf ihre Menge an sCD137 analysiert und mit denen einer gesunden Kontrollgruppe verglichen (Abbildung 21). Die Proben der Psoriasispatienten wurden von Dr. Sascha Gerdes aus der Hautklinik bereitgestellt. Die Seren der Morbus Crohn und Colitis ulcerosa Patienten wurden im Rahmen eines Mini-Proposals des RTG1743 von der AG Bacher, Immunologie, UKSH Kiel, zur Verfügung gestellt.

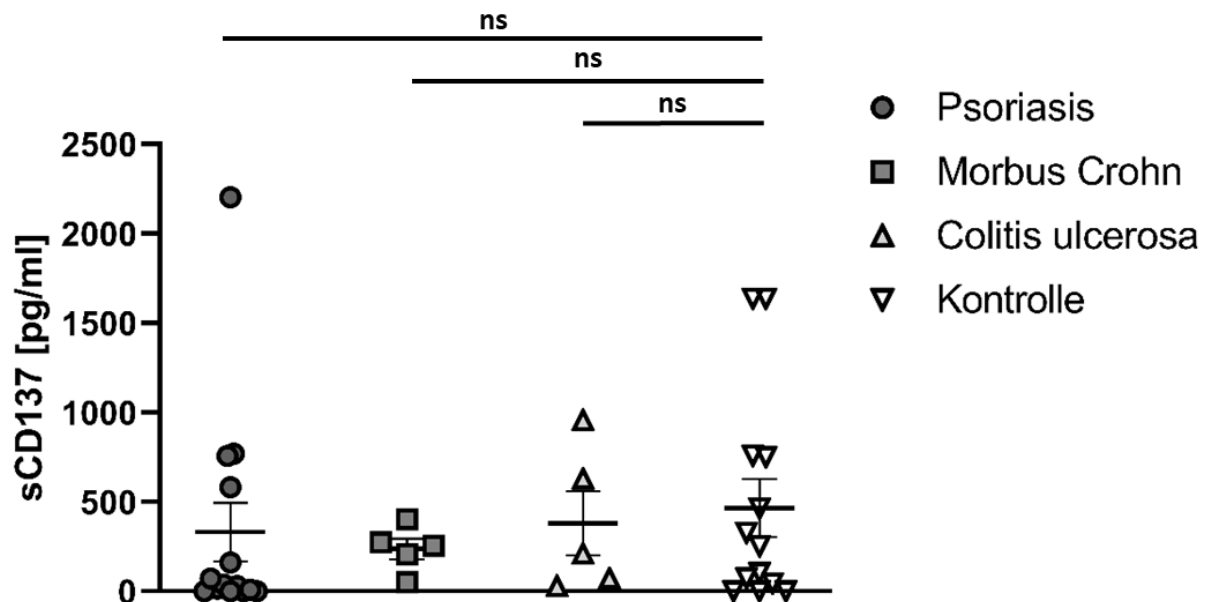


Abbildung 21: sCD137 in Seren von Patienten mit Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Nachweis von sCD137 [pg/ml] im Serum von Patienten mit Psoriasis, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa im Vergleich zur Kontrollgruppe. Psoriasis (n=14), Morbus Crohn (n=5), Colitis ulcerosa (n=5), Kontrollgruppe (n=13). (ns = nicht signifikant zur Kontrollgruppe; MW ± SD)

Es zeigte sich, dass sich der Mittelwert der Menge an sCD137 in allen Patientengruppen nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe unterscheidet. Es konnte lediglich ein erhöhter Wert bei einem Psoriasispatienten detektiert werden. Dies könnte allerdings auch daran liegen, dass der Patient ebenfalls an rheumatoider Arthritis leidet, wie sich später herausstellte. Für rheumatoide Arthritis ist es bereits beschrieben, dass Patienten erhöhte sCD137-Level im

Serum haben. Dass sich die Werte aller Patienten nicht von denen der Kontrollgruppe unterscheiden, könnte auch stark damit zusammenhängen, dass alle unter Medikation stehen, wodurch eine eventuelle Immunreaktion verhindert wird (Abbildung 21).

5 DISKUSSION

Humanes CD137 als ein Mitglied der TNFR-Superfamilie und sein Ligand CD137L werden beide auf Immunzellen und Tumorzellen exprimiert. Bei Bindung der beiden wird eine bidirektionale Signalweiterleitung in die jeweilige Zelle vermittelt und so eine Immunreaktion ausgelöst, die zu Aktivierung, Proliferation und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Erhöhte Serumspiegel von löslichem CD137 (sCD137) wurden in Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis detektiert. Zwar sind derzeit zwei agonistische CD137-Antikörper, Urelumab und Utomilumab, gegen Tumorerkrankungen im Einsatz (Chester *et al.*, 2018), jedoch gibt es noch keine CD137-Antikörpertherapie für Autoimmunerkrankungen. Auf dieser Grundlage ist es von besonderer Bedeutung den Mechanismus hinter der Freisetzung von CD137 aufzuklären und zu verstehen wie sCD137 die Immunantwort von Zellen aber auch AK-basierter Therapien beeinflussen könnten. Bislang ging man davon aus, dass es sich bei sCD137 um eine *Splicing*-Variante handelt. Da jedoch zahlreiche andere Mitglieder der TNFR-Superfamilie durch Sheddasen, vorzugsweise ADAM10 und ADAM17, freigesetzt werden, lag die Vermutung nahe, dass sie auch an der Freisetzung des sCD137 beteiligt sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht nur ADAM10, sondern auch ADAM17 an der Freisetzung von CD137 in transfizierten Zelllinien und in primären T-Zellen verantwortlich sind. Der Einsatz von ADAM10- und -17-Inhibitoren zeigte eine Verringerung von sCD137 in den Kulturüberständen der Zellen, bei gleichzeitiger Akkumulation von CD137 auf der Zelloberfläche.

Außerdem führte sCD137, welches aus Überständen von Zellen gewonnen wurde, die mit hyperaktivem Anoctamin-6 und CD137 transfiziert wurden, zu einer erhöhten T-Zell-Proliferation, was darauf schließen lässt, dass gesheddetes sCD137 funktionell aktiv ist und seinen Liganden immer noch binden kann.

5.1 ADAM10 ALS HAUPTSHEDDASE VON CD137

Die TNFR-Superfamilie nimmt in der Funktionsweise des Immunsystems eine zentrale Rolle ein. Viele bekannte Mitglieder kommen hier nicht nur als membranverankerte Rezeptoren vor, sondern auch in löslicher Form. Die löslichen Rezeptoren werden zum einen durch

alternatives *Splicing* generiert oder durch das Abspalten der membranverankerten Rezeptoren durch Sheddasen (Hehlhans und Pfeffer, 2005; Remouchamps *et al.*, 2011). ADAM17 gilt als Hauptsheddase der TNFR-Superfamilie, da es an der Freisetzung vieler bislang bekannter Mitglieder beteiligt ist. Hierzu zählen u.a. CD40, p75TNFR oder CD27 (Contin *et al.*, 2003; Weskamp *et al.*, 2004; Pupovac und Sluyter, 2016).

So wurden erhöhte Serumlevel von löslichem CD27 (sCD27) in Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden, aber auch bei Lymphom- und Leukämiepatienten (Van Oers *et al.*, 1993; Lens *et al.*, 1998). Des Weiteren ist bislang bekannt, dass sCD27 maßgeblich an der Aktivierung und Proliferation von T-Zellen beteiligt ist und somit eine entscheidende Rolle in der Immunantwort einnimmt (Huang *et al.*, 2013). Wie auch CD27, kommt CD137 sowohl als membranständige als auch lösliche Form vor. Erhöhte Serumspiegel von sCD137 wurden ebenfalls bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, detektiert. Hier ging man bislang allerdings davon aus, dass es sich um ein Produkt alternativen *Splicings* handelt (Michel *et al.*, 1998). Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen CD27 und CD137 lag die Vermutung nahe, dass sCD137 nicht nur ein Produkt alternativen *Splicings* sein könnte, sondern ebenfalls durch proteolytische Freisetzung durch eine Metalloprotease generiert werden könnte.

Um eine Beteiligung einer Metalloprotease und deren Anteil an der Freisetzung von sCD137 zu überprüfen, wurden transfizierte HT29-Zellen mit dem Breitband-Metalloprotease-Inhibitor Marimastat (MM), einem präferenziellen ADAM10-Inhibitor GI oder GW, einem ADAM10- und -17-Inhibitor behandelt. GI zeigte hierbei einen stärkeren inhibitorischen Effekt als GW, jedoch zeigte MM den stärksten Effekt auf die CD137-Freisetzung. Die Stimulation in den HT29-Zellen mit Ionomycin oder Melittin, welche ADAM10 und -17 aktivieren können, erhöhte die Freisetzung von CD137 im Vergleich zur konstitutiven Freisetzung. Somit konnte gezeigt werden, dass die CD137-Freisetzung Metalloprotease-abhängig ist und ADAM10 vermutlich die Hauptsheddase von CD137 in HT29 darstellt.

Dieser Hinweis sollte durch die Verwendung von ADAM10/ADAM17-defizienten HEK293T-Zellen (dKO) im Vergleich zum HEK293T Wildtyp (WT) überprüft werden. Beide Zelllinien wurden ebenfalls wieder mit den Inhibitoren und Stimulanzen behandelt. Auch hier zeigte sich der inhibitorische Effekt, wobei MM und GW zu der stärksten Inhibition führten. In den HEK WT-Zellen konnten sogar alle drei Aktivatoren das Shedding stimulieren. PMA weist hier zusätzlich auf eine Beteiligung von ADAM17 hin. Das konstitutiv sehr niedrige Shedding in den

unbehandelten dKO ließ sich weder durch Zugabe der Inhibitoren noch der Aktivatoren beeinflussen.

Diese Ergebnisse zeigten, dass ADAM10 und/oder ADAM17 maßgeblich am Shedding von CD137 beteiligt sind. Da jedoch Inhibitoren und Aktivatoren nicht zu 100 % spezifisch sind (Hundhausen *et al.*, 2003; Ludwig *et al.*, 2005) wurden Experimente, in denen entweder ADAM10 oder ADAM17 in HEK dKO retransfiziert wurden, durchgeführt. Hier zeigte sich, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 in der Lage sind CD137 zu shedden. Bei der Freisetzung anderer Substrate sind diese kompensatorischen Mechanismen der beiden Proteasen bei Defizienz der jeweils anderen bereits bekannt. Je nach Zelltyp und Stimulus kann ein Substrat entweder durch ADAM10 oder ADAM17 gesheddet werden. So ist ADAM17 unter normalen Bedingungen die Hauptsheddase von TGF- α . Fehlt ADAM17 allerdings, wird TGF- α durch den kompensatorischen Mechanismus durch ADAM10 freigesetzt (Le Gall *et al.*, 2009; Garbers *et al.*, 2011).

Wieso in HT29 allerdings größtenteils nur ADAM10 eine Rolle spielt, ist bislang nicht klar. Denkbar wäre, dass weniger ADAM17 in diesen Zellen vorhanden ist. Dafür spricht, dass bereits für einige andere Zelltypen beschrieben wurde, dass ADAM10 stärker als ADAM17 exprimiert wird (Ebsen *et al.*, 2013). Dies ließe sich z.B. mittels spezifischem Antikörper gegen ADAM10 und -17 im *Western Blot* oder mittels Durchflusszytometrie bestimmen. Eventuell könnte aber auch die ADAM17-Sheddingaktivität durch das Vorhandensein anderer Substrate in den HT29 voll ausgelastet sein. Auch die Anordnung der Sheddasen und des Rezeptors in der Zellmembran könnte eine Rolle spielen. So könnten Nanodomänen in der Zellmembran verschiedener Zellen unterschiedlich zusammengesetzt sein und sich so die unterschiedliche ADAM-Aktivierung erklären (Reiss und Bhakdi, 2017).

Die bisherigen Untersuchungen von sCD137 gingen alle davon aus, dass es sich hierbei um eine *Splicing*-Variante handelt, welche von aktivierten T-Zellen exprimiert wird (Pollok *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994; Hurtado *et al.*, 1995;). In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass in CD137-tansfizierten Zellen ADAM10 und -17 maßgeblich an der Freisetzung beteiligt sind und es sich nicht ausschließlich um eine *Splicing*-Variante handelt. Nun stellte sich jedoch die Frage, ob dies auch in Zellen der Fall ist, welche CD137 endogen exprimieren. Hierfür wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen untersucht und ebenfalls mit den Inhibitoren behandelt. Hier kam es ebenfalls zur Inhibition des CD137-Sheddings durch

alle drei Inhibitoren. Zusätzlich zeigten die FACS-Analysen, dass CD137 auf der Oberfläche der T-Zellen nach Zugabe von MM, GI, und GW stärker akkumulierte als bei den unbehandelten Zellen. Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass CD137 durch die Sheddingaktivität von ADAM10 und -17 in humanen Zellen freigesetzt werden kann.

In murinen Zellen haben Taraban *et al.*, 2002, ein ähnliches Indiz geliefert. Sie zeigten mittels eines Breitband-Metalloprotease-Inhibitors, dass CD137 auf der Oberfläche muriner T-Zellen akkumulierte. Allerdings konnte diese Erkenntnis nicht direkt auf den Menschen übertragen werden, da das menschliche Immunsystem deutlich spezifischer als das der Maus ist (Zschaler *et al.*, 2014). Es hätte also durchaus sein können, dass in humanen Zellen ein anderer Mechanismus an der CD137-Freisetzung beteiligt gewesen wäre. All die vorangegangenen Ergebnisse beweisen aber, dass sCD137 in den Überständen transfizierter Zellen und humaner primärer Lymphozyten auch auf die Sheddingaktivität von ADAM10 und ADAM17 zurückzuführen ist. Bislang fehlen allerdings Untersuchungen, die die relative Menge an gesheddetem und gespleißtem sCD137 miteinander vergleichen.

Alle derzeit veröffentlichten Untersuchungen von sCD137 beziehen sich bei ihrer Aussage, dass es sich bei sCD137 um eine *Splicing*-Variante handelt, auf Michel *et al.*, 1998. Hier wurde jedoch nie gezeigt, dass ein erhöhtes sCD137-Level im Überstand der Zellen mit einem erhöhten mRNA-Level der *Splicing*-Varianten korreliert. Deswegen besteht die Möglichkeit, dass die auf Proteinebene gemessenen Werte an sCD137 nicht nur durch *Splicing*, sondern auch durch Shedding zustande gekommen sind. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass nur, weil die mRNA für den löslichen Rezeptor in der Zelle vorhanden ist, dies nicht unmittelbar bedeutet, dass er synthetisiert wird. So zeigten Versuche mit dem IL-5- und dem MPL-Rezeptor hohe mRNA-Level für die löslichen Formen. Auf Proteinebene konnte jedoch kein löslicher Rezeptor nachgewiesen werden (Devos *et al.*, 1993; Skoda *et al.*, 1993).

Einige Rezeptoren werden aber sowohl durch *Splicing* als auch durch Shedding produziert. Das Shedding des membranständigen CD137 durch ADAM10/17 könnte als regulatorisches Element dienen, da die Menge an Oberflächenrezeptor abnimmt und die Signalfähigkeit der Zelle verringert wird. Dies konnte bereits für das TNFR-Superfamilienmitglied CD40 gezeigt werden (Contin *et al.*, 2003).

5.2 POTENTIELLE BEDEUTUNG DES SHEDDINGS FÜR DIE CD137/CD137-LIGANDEN-INTERAKTION

Die Abspaltung von Rezeptoren von der Zelloberfläche wird als wichtiger Mechanismus angesehen, über den die Zelle Signale, welche durch den membrangebundenen Rezeptor vermittelt wurden, verstärken oder blockieren kann (Choi und Kim, 2005; Cartier *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2013). So wirkt z.B. löslicher TNFR1 inhibierend bei Ligandenbindung (Van Zee *et al.*, 1992), während löslicher IL-6-Rezeptor agonistisch wirkt und Entzündungsreaktionen verstärkt (Hirano, 1998).

Derzeit wird davon ausgegangen, dass die *Splicing*-Varianten des sCD137 an ihren Liganden binden können und in aktivierten Splenozyten die IL-10- und IL-12-Sekretion blockieren (Shao *et al.*, 2008). Das von Shao *et al.*, 2008, für die Untersuchungen der sCD137-Funktion verwendete rekombinante Peptid ist durch Vorhandensein des N-Terminus nicht nur mit den beiden *Splicing*-Varianten, sondern auch mit der Shedding-Variante identisch, wodurch keine Differenzierung der verschiedenen Varianten stattfinden kann.

In Mäusen konnte gezeigt werden, dass viele Tumore unter hypoxischen Bedingungen in der Lage sind sCD137 zu exprimieren mit minimaler bis gar keiner mCD137-Expression (Labiano *et al.*, 2016). Es wird vermutet, dass sCD137 direkt oder indirekt die Aktivierung der Antigen-präsentierenden Zellen hemmt und so mCD137 antagonisiert. sCD137 könnte die Interaktion des mCD137 mit seinem mCD137-Liganden auf zwei unterschiedliche Wege stören. Zum einen könnte sCD137 durch direkte Bindung an den mCD137-Liganden die Interaktion mit mCD137 blockieren (Abbildung 22). Dieser Mechanismus ist bereits für andere TNF-Rezeptoren demonstriert worden (Chan *et al.*, 2000). Außerdem konnte für murines sCD137 bereits gezeigt werden, dass es Trimere bildet. So könnte das Konkurrieren mit mCD137 um die Bindung möglich und wahrscheinlich sein (Shao *et al.*, 2008). Bislang ist aber noch nicht geklärt, ob bei Bindung des sCD137 an den Liganden trotzdem eine Signalweiterleitung durch den Liganden vermittelt werden könnte. Zum anderen könnte es sich in ein mCD137-Trimer einfügen und durch die nicht mehr mögliche Trimerisierung des mCD137 die Signalweiterleitung des Rezeptors stören. Auf diese Weise könnten sCD137-produzierende T-Zellen ihre eigene Stimulation regulieren (Luu *et al.*, 2020; Abbildung 22). Dieser mögliche Mechanismus wurde so jedoch noch nicht für sCD137 demonstriert.

Bei der Bindung von mCD137 an seinen Liganden wird über die bidirektionale Signalübertragung auch ein Signal in die Liganden-exprimierende Zelle vermittelt (Dharmadhikari *et al.*, 2016). Für monozytäre Zellen, wie die THP1-Zellen, welche den CD137-Liganden exprimieren, konnte gezeigt werden, dass die IL-8-Produktion bei Bindung des Rezeptors gesteigert wird (Moh *et al.*, 2013).

Es stellte sich also die Frage, ob sCD137 als Sheddingprodukt bei Bindung an seinen Liganden nicht trotzdem eine Signalweiterleitung in die Liganden-exprimierende Zelle vermitteln könnte und ähnlich funktionell aktiv ist wie andere lösliche TNF-Rezeptoren (Aderka *et al.*, 1992; Higuchi und Aggarwal, 1992). Für diese Arbeit wurden deshalb aktivierte THP1- und HL60-Zellen ausgewählt und mit CD137-transfizierten HEK-Zellen direkt oder indirekt kultiviert. Die IL-8-Konzentrationen in den Zellüberständen zeigten allerdings kaum Unterschiede. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die HEK-Zellen noch weitere Proteine exprimieren, welche ebenfalls die IL-8-Produktion erhöhen. Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die Aktivierung der Zellen mit PMA die IL-8-Konzentration beeinflusst hat. Dies wurde bereits für einige Zellen beschrieben (Smyth *et al.*, 1991; Wilmer und Luster, 1995).

Für weitere Untersuchungen wurde also ein System benötigt, bei dem gesheddetes sCD137 in Zellüberständen vorhanden ist, aber keine externen Stimulanzien. Wie vorherige Versuche aus unserer Arbeitsgruppe zeigten, wird vermehrt CD137 von der Zelloberfläche gesheddet, wenn diese zusätzlich mit der hyperaktiven Scramblase ANO6 transfiziert wurden. So konnten Kulturmedien produziert werden, welche angereichertes gesheddetes sCD137, aber keinen externen Stimulus wie PMA beinhalten. Da auch aktivierte T-Zellen den CD137-Liganden exprimieren (Goodwin *et al.*, 1993; Pollok *et al.*, 1993; Alderson *et al.*, 1994) wurde in dieser Arbeit die Auswirkung von gesheddetem sCD137 auf die T-Zellen untersucht. Diese wurden mit dem sCD137-angereicherten Medium behandelt und zeigten danach eine erhöhte Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass gesheddetes sCD137 an seinen Liganden binden und über seine funktionelle Aktivität eine Zellantwort auslösen kann.

Diese Erkenntnisse stehen allerdings im Gegensatz zu bereits veröffentlichten Untersuchungen. Eun *et al.* zeigten 2015, dass immobilisiertes sCD137 die T-Zell-Aktivität reduziert. Diese Beobachtungen wurden allerdings nur in murinen T-Zellen gemacht. Außerdem wurden die Zellen nur mit CD3-Antikörper in geringer Konzentration von 0,1 µg aktiviert. Bei

Aktivierung der Zellen mit CD3-/CD28-Antikörpern zeigte sich dieser Effekt weniger stark. Diese Ergebnisse lassen sich schlecht mit denen in dieser Arbeit vergleichen, da sich die Immunsysteme von Mensch und Maus wie bereits erwähnt deutlich unterscheiden (Zschaler *et al.*, 2014). Außerdem liefert der CD3-Antikörper zwar ein Aktivierungssignal für die Zelle (Kay, 1991), die Proliferation hängt jedoch von dem kostimulierenden Signal ab, welches normalerweise durch anti-CD28 ausgelöst wird (Frauwirth und Thompson, 2002). Es könnte also durchaus sein, dass die Zellen bei einfacher Aktivierung durch anti-CD3 anders agieren, als in dieser Arbeit gezeigt. Außerdem wurde in der vorliegenden Arbeit kein immobilisiertes CD137 verwendet.

Bereits 1996 berichteten Schwarz *et al.*, dass murines immobilisiertes CD137 die Proliferation von murinen PBMCs reduziert. Auch hier ist ein Vergleich zu den vorliegenden Daten schwer, da hier differenzierte Populationen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verwendet wurden. Schwarz *et al.* hingegen verwendeten für ihre Untersuchungen die Gesamtheit der PBMCs. Sie beinhalteten also nicht nur T-Zellen, sondern u.a. auch B- und NK-Zellen. Des Weiteren fanden sie heraus, dass die Proliferation der PBMCs bei Zugabe von mobilisiertem sCD137 nicht verringert war. Die Proliferation der Zellen befand sich sogar knapp über dem Level der Kontrollgruppe (Schwarz *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferation der T-Zellen anhand des zellulären ATP-Gehalts gemessen. Dieser wird zwar standardmäßig verwendet, um einen Rückschluss auf die T-Zellzahl zu ziehen (Ishizaka *et al.*, 1984; Crouch *et al.*, 1993; Petty *et al.*, 1995), allerdings könnte der ATP-Anstieg der Zelle auch auf eine gesteigerte mitochondriale Funktion zurückzuführen sein (Brookes *et al.*, 2004). Des Weiteren wurden die Zellen bereits 72 h nach Aktivierung auf ihre Proliferation gemessen. Zu diesem Zeitpunkt fangen T-Zellen in der Regel erst an zu Proliferieren (Lafuente *et al.*, 2003). Ein Messen der Zellen nach einem längeren Zeitraum, beispielweise nach 96 h, könnte die hier detektierten Unterschiede wohlmöglich noch stärker zur Geltung bringen. Um zusätzlich Klarheit darüber zu bekommen, dass es sich hier wirklich um eine T-Zell-Proliferation handelt, sollten weitere Versuche wie z.B. Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau oder Durchflusszytometrie folgen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass ein großer Teil von sCD137 in Überständen humaner Zellen auf ADAM10/17-vermittelte Freisetzung zurückzuführen ist. Außerdem führt gesheddetes sCD137 zu einer erhöhten Proliferation von T-Zellen. Der genaue Mechanismus

ist bislang aber immer noch ungeklärt. So könnte es sein, dass gesheddetes sCD137 an den membranständigen Liganden bindet und so trotzdem eine Signalantwort in die Liganden-bindende Zelle auslöst (Abbildung 22B). Denkbar wäre es auch, dass sich ein sCD137-Monomer in ein mCD137-Trimer einfügt und dieser Rezeptorkomplex so die Möglichkeit hat, trotzdem an seinen Liganden zu binden und Signale zu vermitteln (Abbildung 22C).

Derzeit ist bekannt, dass sCD137-Ligand von der Zelloberfläche durch eine Matrix-Metalloprotease freigesetzt werden kann und so auch in löslicher Form vorkommt (Salih *et al.*, 2001). Durch das Vorhandensein von CD137 und des CD137-Liganden auf T-Zellen wäre es denkbar, dass es zu einer autokrinen Signalaktivierung kommen könnte. Autokrine Signalaktivierung bedeutet, dass ein Ligand von einer Zelle freigesetzt wird und an den Rezeptor derselben Zelle binden kann. Dies wurde so bereits für EGFR und seinen Liganden HB-EGF beschrieben (Prenzel *et al.*, 2000; Singh und Harris, 2005). Autokrine Signalaktivierung spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Zellfunktion. Jedoch ist bislang nicht bekannt, ob sich die Zellantwort bei autokriner Aktivierung von Signalen, welche durch exogene oder parakrine Präsentation der Liganden vermittelt wird, unterscheidet (Massague und Pandiella, 1993; Maheshwari *et al.*, 2001).

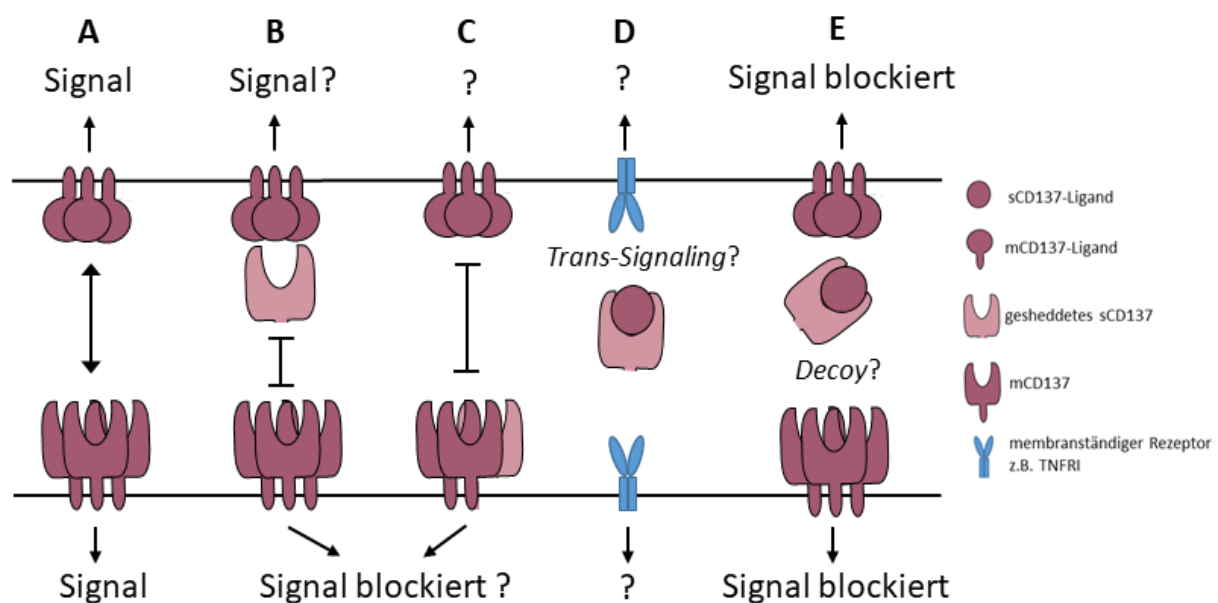


Abbildung 22: Schematische Darstellung der möglichen Wirkmechanismen von sCD137. (A) Der trimerisierte Rezeptor bindet an den trimerisierten Liganden und führt zur bidirektionalen Signalübertragung. (B) Ein sCD137-Monomer konkurriert mit einem mCD137-Trimer um eine Bindung an den CD137-Liganden. (C) Ein sCD137-Monomer fügt sich in ein mCD137-Trimer ein. (D) sCD137 bindet an sCD137-Liganden und führt über *Trans-Signaling* zur Aktivierung eines membranständigen Rezeptors. (E) sCD137 und sCD137-Ligand binden aneinander. Keiner der beiden kann an den membrangebundenen Gegenspieler binden und es kommt zur Signalblockierung. (Modifiziert nach Luu *et al.*, 2020)

Es könnte ebenfalls durch Bindung des sCD137 mit sCD137-Ligand auch zu einem sogenannten *Trans-Signaling* kommen. Dieser Prozess wurde bislang nur für den löslichen IL-6-Rezeptor beschrieben. Löslicher IL-6-Rezeptor bindet seinen löslichen Liganden und interagiert mit gp130, einem membrangebunden Glykoprotein. Die Interaktion des löslichen Rezeptor/Liganden-Paares mit gp130 führt schlussendlich zur Signalaktivierung und -weiterleitung (Taga *et al.*, 1989; Hibi *et al.*, 1990; Rose-John, 2012;). Dieser Prozess wäre für CD137 auch denkbar, da sowohl CD137 als auch sein Ligand in löslicher Form vorliegen können. Des Weiteren wurde beschrieben, dass TNFRI als Korezeptor für den CD137-Liganden wirkt und so der TNFRI-Signalweg aktiviert wird (Moh *et al.*, 2013). Die Bindung des löslichen Rezeptor/Liganden-Paares könnte als parakriner Faktor wirken und über andere Proteine oder Rezeptoren wie z.B. TNFRI zur Signalaktivierung führen (Abbildung 22D).

Unabhängig vom *Trans-Signaling* wäre es auch denkbar, dass entweder sCD137 oder sCD137-Ligand seinen löslichen Gegenspieler abfängt und so eine inhibierende Wirkung hat. Der abgefangene lösliche Partner könnte nicht mehr an den membranständigen Rezeptor oder Ligand binden und eine Signalweiterleitung wird blockiert (Abbildung 22E). Dies konnte bereits für einige Rezeptor/Liganden-Paare gezeigt werden. So bindet lösliches TNFRI an TNF α , wodurch TNF α nicht mehr an den membranständigen Rezeptor binden kann und eine zu starke Signalweiterleitung unterbunden wird.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sCD137 durch ADAM10 und -17 freigesetzt wird und nicht nur durch alternatives *Splicing*. Des Weiteren führt durch Shedding freigesetztes sCD137 zu einer erhöhten Proliferation in T-Zellen. Über welchen Wirkmechanismus dies jedoch vonstattengeht bleibt weiterhin ungeklärt (Abbildung 23).

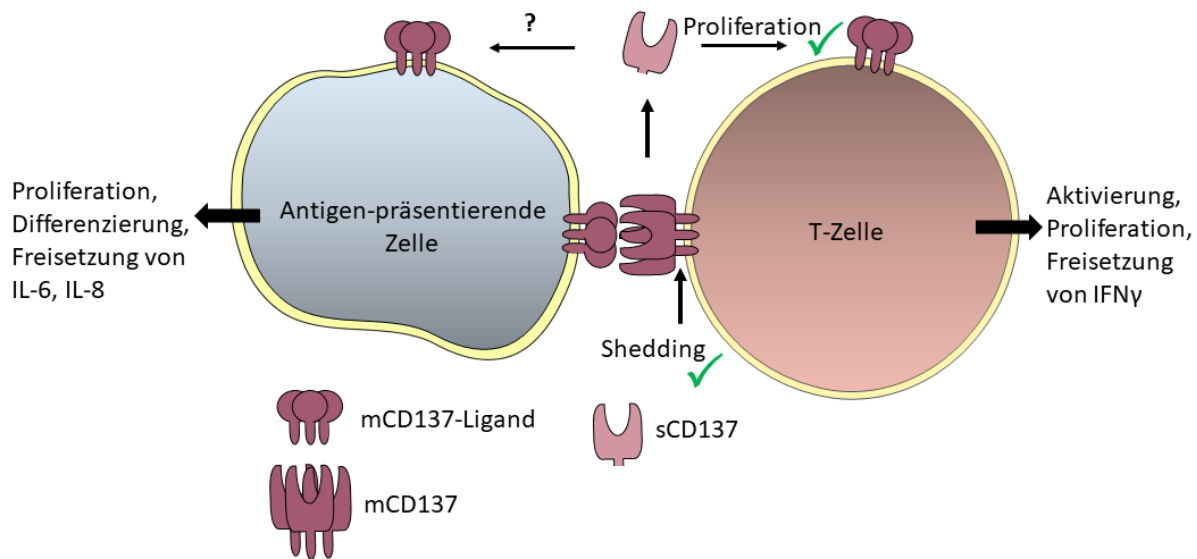


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Signalübertragung des CD137/CD137-Liganden-Systems. CD137 wird von ADAM10 und -17 durch proteolytisches Shedding von der Zelloberfläche freigesetzt und führt durch Bindung an den membranständigen Liganden zur Zellproliferation (modifiziert nach Dharmadhikari *et al.*, 2016).

5.3 KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED VON sCD137 IN SEREN VON AUTOIMMUN-ERKRANKTEN PATIENTEN

sCD137 wurde erstmals 1998 in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) nachgewiesen. Die sCD137-Spiegel der RA-Patienten waren im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöht. Dieser Zustand ist vermutlich auf eine Lymphozytenaktivierung zurückzuführen (Michel *et al.*, 1998). Daraufhin folgten weitere Studien bei Maus und Mensch, die ebenfalls erhöhte sCD137-Serum-Level bei Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. systemischer Lupus erythematoses oder Multipler Sklerose (MS) (Sharief, 2002; Shao *et al.*, 2008;). Man geht bislang davon aus, dass sCD137 als negativer Rückkopplungsmechanismus fungiert. Durch Bindung an seinen membranständigen Liganden wird vermeintlich die Wechselwirkung zwischen mCD137 und mCD137-Ligand unterbunden und so eine erhöhte T-Zell-Aktivierung verhindert (Hurtado *et al.*, 1995; Michel und Schwarz, 2000).

Regulatorische T-Zellen (Tregs) gelten als Hauptquelle für sCD137 (Schoenbrunn *et al.*, 2012), während CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als Hauptquelle für mCD137 gelten (Itoh *et al.*, 2019). Unter normalen physiologischen Bedingungen konkurrieren mCD137 und sCD137 gleichermaßen um den Liganden. In Autoimmunerkrankungen hingegen kommt es zu einem Expandieren von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und somit zu mehr mCD137, welches an den Liganden binden kann.

Insgesamt kann die gleichbleibende Produktion von sCD137 der verstärkten mCD137-Expression nicht entgegenwirken und ist weiterhin löslich in z.B. Seren detektierbar. Eventuell wird auch versucht durch verstärkte sCD137-Expression der erhöhten Immunreaktion entgegenzuwirken (Wong und Schwarz, 2020), wodurch die erhöhten sCD137-Level in Autoimmunpatienten erklärbar sind. Es gibt also starke Hinweise darauf, dass eher die verstärkte CD137/CD137-Ligand-Wechselwirkung an Entzündungen beteiligt ist, statt sCD137 (Drenkard *et al.*, 2007; Olofsson *et al.*, 2008). So konnte beispielsweise in verschiedenen Mausmodellen die schwere der Autoimmunerkrankungen in Abwesenheit der CD137/CD137-Ligand-Wechselwirkung reduziert werden (Seo *et al.*, 2004; Haga *et al.*, 2009; Olofsson *et al.*, 2008;).

Ebenso spielen ADAM10 und -17 in Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle. Sie werden in allen Zellen mit einer Vielzahl von Substraten exprimiert. Eine Dysregulation ihrer Aktivität führt häufig zu pathophysiologischen Veränderungen und Krankheiten (Smith *et al.*, 2020). So ist die Hochregulierung von ADAM10 und die Freisetzung seines Substrats CXCL16 maßgeblich an entzündungsfördernden Prozessen in RA-Patienten beteiligt (Voort *et al.*, 2005). Genauso zeigte sich in RA-Patienten eine erhöhte ADAM17-Aktivität (Ohta *et al.*, 2001). Eine Studie in Psoriasis-Patienten zeigte erhöhte ADAM10-Level in Keratinozyten psoriatischer Läsionen (Oh *et al.*, 2008), ebenso wie erhöhte ADAM17-Level (Kawaguchi *et al.*, 2005). In Morbus Crohn Patienten wurde während der aktiven Phase der Entzündung eine Hochregulierung von ADAM17 in den intestinal epithelialen Zellen detektiert (Cesaro *et al.*, 2009).

Auch CD137 steht in Verbindung mit diesen Autoimmunerkrankungen. So konnte in Psoriasis-Patienten eine erhöhte Expression von CD137 innerhalb der Psoriasis-Läsionen gefunden werden (Swindell *et al.*, 2014; Dehnavi *et al.*, 2021). Ebenfalls wurden erhöhte CD137-Werte in entzündetem Darmgewebe von Colitis ulcerosa (UC) und Morbus Crohn (CD) Patienten gefunden (Maerten *et al.*, 2006). Obwohl es also starke Hinweise gibt, dass CD137 auch eine Rolle in diesen Autoimmunerkrankungen spielt, musste die Korrelation zu sCD137 noch untersucht werden.

Dazu wurden in dieser Arbeit die Seren von Patienten mit Psoriasis, UC und CD auf ihr sCD137-Level im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht. Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle detektiert werden. Dies könnte zum einen daran liegen, dass sich auch einige Ausreißer nach oben in der Kontrollgruppe befinden, da hier auch niemals ganz ausgeschlossen werden kann, dass doch eine Vorerkrankung vorliegt. Des Weiteren stellte

sich im Nachhinein heraus, dass alle untersuchten Patienten bereits unter systemischer Therapie standen. Es wäre also nochmals von Interesse die Seren von unbehandelten Patienten zu messen, um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu bekommen.

Wenn der genaue Mechanismus hinter der CD137-/CD137-Liganden-Wechselwirkung und der Freisetzung von sCD137 geklärt und verstanden ist, könnten anti-CD137-Antikörper zur therapeutischen Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie RA oder SLE eingesetzt werden. Außerdem könnte der sCD137-Spiegel im Blut als Marker für bestimmte Erkrankungen eingesetzt werden.

Hohe Level an sCD137 konnten außerdem in vielen Tumoren gefunden werden (Furtner *et al.*, 2005; Dimberg *et al.*, 2006). Man geht davon aus, dass Tumore sCD137 freisetzen, um die CD137/CD137-Liganden-Interaktion zu stören und so die kostimulierenden Signale zu blockieren (Labiano *et al.*, 2016). Es konnte bisher gezeigt werden, dass es bei Verabreichung eines agonistischen CD137-Antikörpers zur Immunreaktion gegen Tumore kommt (Shuford *et al.*, 1997; Blazar *et al.*, 2001). Derzeit befinden sich zwei agonistische Antikörper in klinischen Studien als mögliche Therapie gegen Tumore (Chester *et al.*, 2018). Überraschenderweise zeigten Studien an Mäusen, welche an Enzephalomyelitis oder systemischer Lupus erythematodes leiden, dass die Gabe eines agonistischen CD137-Antikörpers, die Entwicklung und schwere der Erkrankungen vermindert werden konnte (Sun *et al.*, 2002; Foell *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die Wirkung auf die Aktivierung der T-Zellen bei gleichzeitiger Blockierung der Ligandenbindung zurückzuführen ist. Hierdurch wird das Ausschütten pro-inflammatorischer Zytokine unterbunden, die T-Zell-Aktivierung bleibt jedoch davon unbeeinträchtigt (Dharmadhikari *et al.*, 2016). Jedoch bleibt bislang ungelöst, weshalb agonistische CD137-Antikörper keine immun-hemmende Wirkung bei der Tumorthherapie haben und weshalb sie die Immunaktivität in Autoimmunerkrankungen nicht verstärken. Eventuell könnte es ein Problem darstellen, dass der agonistische Antikörper sCD137 abfängt.

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die sCD137-Freisetzung durch ADAM10 und -17 initiiert wird, könnte ein weiterer therapeutischer Ansatz weniger auf der Aktivierung oder Blockierung des CD137-/CD137-Ligandenpaares, sondern vielmehr auf Aktivierungsmechanismen der ADAMs liegen.

5.4 AUSBLICK

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sCD137 in humanen Zellen durch ADAM10 und -17 freigesetzt wird. Der genaue Anteil an *Splicing*-Varianten und an durch ADAMs freigesetztem sCD137 wurde bisher nicht ermittelt. Dies könnte mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren und Messungen der mRNA mittels RT-qPCR untersucht werden. Mögliche Strukturunterschiede der verschiedenen sCD137-Varianten könnten mit massenspektrometrischen Analysen mittels TOF-MS detektiert werden.

Des Weiteren könnten Untersuchungen zur genaueren Wirkungsweise von gesheddetem sCD137 folgen. So ist bislang immer noch unklar, ob sCD137 direkt mit dem Liganden interagiert oder sich in ein mCD137-Trimer einbaut. Außerdem ist die Rolle des sCD137-Liganden im Wechselspiel mit dem mCD137 oder sCD137 noch nicht untersucht worden und könnte ein weiterer therapeutischer Ansatz sein.

Sowohl ADAM10 als auch ADAM17 zeigen ein verstärktes Auftreten in Tumoren und entzündlichen Erkrankungen. Hier könnte ebenfalls eine mögliche Korrelation mit der Häufung von sCD137 zu beobachten sein. Unter welchen Umständen die Regulation und Aktivierung der Proteasen und die damit verbundene CD137-Substratfreisetzung erhöht wird muss in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden. Da bisher nur davon ausgegangen wurde, dass es sich bei sCD137 um eine *Splicing*-Variante handelt, bietet die Erkenntnis, dass ADAM10- und -17 an der Freisetzung mit involviert sind, ein erweitertes Verständnis der Regulation und einen Ausgangspunkt um die vielfältigen Funktionen besser zu verstehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

CD137, ein Mitglied der TNFR-Familie, wird vor allem auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Die Rezeptoraktivierung wird durch die Bindung seines Liganden, CD137-Ligand, welcher vorwiegend auf Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) vorkommt, initiiert. Sowohl der Rezeptor als auch der Ligand kommen in membranständiger als auch löslicher Form vor. Die Aktivierung des membranständigen Rezeptors führt u.a. zu Proliferation und Aktivierung der T-Zelle. Durch bidirektionale Signalübertragung kommt es auch zu einer Signalweiterleitung durch den membranständigen CD137-Ligand in die APCs. Eine erhöhte Expression von CD137 wurde in Zellen von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Morbus Crohn oder Psoriasis, detektiert. Außerdem wurden erhöhte Level an löslichem CD137 (sCD137) in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Multipler Sklerose nachgewiesen. Bislang ging man davon aus, dass es sich bei sCD137 um eine *Splicing*-Variante handelt. ADAM10 und ADAM17, als bekannteste Vertreter der *a disintegrin and metalloproteases* (ADAMs) Proteasen-Familie, spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in vielen Autoimmunerkrankungen. So gibt es oftmals eine Korrelation zwischen einer erhöhten ADAM-Aktivierung und der Schwere der Erkrankung.

Da ebenfalls viele Rezeptoren der TNFR-Familie durch Metalloproteasen freigesetzt werden, sollte im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden, ob Proteasen auch an der Freisetzung von CD137 beteiligt sind und welche dies sein könnten. Des Weiteren sollte untersucht werden, welche Funktion die Shedding-Variante hat.

Der Einfluss der Inhibitoren Marimastat, GI und GW und der Stimulanzen Ionomycin, PMA und Melittin auf die Aktivität von ADAM10 und -17 und die eventuell damit verbundene Freisetzung von CD137 wurde in verschiedenen Zellen analysiert. Die Untersuchungen in CD137-transfizierten Zellen mittels ELISA ergaben, dass CD137 in HT29-Zellen vorrangig durch ADAM10 freigesetzt wird. Experimente in HEK WT-Zellen zeigten dann aber, dass auch ADAM17 CD137 von der Oberfläche der Zellen abspalten kann. Ebenso geht ein großer Teil von sCD137 in Überständen humaner T-Zellen, welche CD137 endogen exprimieren, auf ADAM10/-17 vermittelte Freisetzung zurück. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass ADAM10 und -17 die Hauptsheddases von CD137 sind und sCD137 nicht nur ein Produkt alternativen *Splicings* ist.

Derzeit ist nicht genau klar, wie sCD137 wirkt. Man geht davon aus, dass der lösliche Rezeptor an seinen Liganden bindet, um die Signalweiterleitung zu blockieren. In humanen Zellen wurde bislang nur veröffentlicht, dass immobilisiertes rekombinantes sCD137 die T-Zell-Aktivität reduziert. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht immobilisiertes sCD137, welches durch Shedding freigesetzt wurde, zu einer erhöhten Proliferation von T-Zellen führt. Wie genau dieser Mechanismus jedoch funktioniert, ist noch ungeklärt.

Da bereits erhöhte sCD137-Level in Seren von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose nachgewiesen werden konnten, lag die Vermutung nahe, dass es auch zu erhöhten Leveln in Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen kommt. In entzündlichen Regionen von Psoriasis-, Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten konnte mehr sCD137 im Vergleich zu gesunden Regionen und Zellen detektiert werden. Deshalb wurden Seren von diesen Patienten ebenfalls auf ihr sCD137-Level untersucht. Es zeigte sich jedoch kein Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe, was aber vermutlich auf die andauernde Medikation der Patienten zurückzuführen war.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass CD137 durch eine Metalloprotease freigesetzt wird, bestätigen und ADAM10 und -17 als Hauptsheddasen von CD137 identifiziert werden. Außerdem zeigte sich, dass CD137, welches durch Shedding freigesetzt wurde, in der Lage ist die T-Zell-Proliferation zu erhöhen. Diese Erkenntnisse können ein besseres Verständnis des Regulationsprozesses von sCD137 liefern und damit einen Blick auf neue therapeutische Strategien für Autoimmunerkrankungen liefern, welche mit erhöhten sCD137-Leveln einhergehen.

7 SUMMARY

CD137, a member of the TNFR family, is mainly expressed on activated T cells. Interaction with its ligand, CD137 ligand, which is predominantly expressed on antigen-presenting cells (APCs), initiates activation of the receptor. CD137/CD137L both exist as a membrane-anchored protein as well as a soluble entity. Activation of the membrane-anchored receptor leads to activation and proliferation of T cells. Due to bidirectional signaling, interaction of CD137 with its ligand also leads to activation of APCs. Increased expression of CD137 has been reported for different autoimmune diseases including Crohn's disease or psoriasis. Furthermore, elevated levels of soluble CD137 (sCD137) have been detected in serum from patients with rheumatoid arthritis or multiple sclerosis. To date, sCD137 was considered to be a splice variant. The two most prominent members of a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) family are ADAM10 and ADAM17, which are also involved in many autoimmune diseases. Increased activation of ADAM10/17 often correlates with the severity of the disease.

Since many receptors of the TNFR family are shed by metalloproteases, the aim of this study was to examine whether CD137 can be shed by one or more proteases. A second goal was to address the potential functional role of the shed variant.

Different cell lines were used to determine the effect of the inhibitors marimastat, GI and GW and the stimulants ionomycin, PMA and melittin on the activity of ADAM10 and -17 and on the release of sCD137. ELISA experiments with CD137-transfected HT29-cells showed that CD137 is primarily released by ADAM10. However, similar experiments with HEK WT cells revealed that ADAM17 is also able to shed CD137 from the cell surface. In addition, a large amount of sCD137 in the supernatants of human cells, which endogenously express CD137, is due to ADAM10-/17-mediated shedding. For the first time, this study revealed ADAM10 and -17 as main sheddases of sCD137 and showed that sCD137 is generated mainly by shedding.

The role of sCD137 is unclear. The soluble receptor is considered to block signal transmission by binding to its ligand. Tumors in mice express high levels of sCD137, which is assumed to inhibit the interaction of mCD137 on T cells with the membrane-bound ligand. So far, it has only been reported that immobilized sCD137 reduces T cell activity in human cells. In this thesis, it could be demonstrated that non-immobilized sCD137, which was released by

shedding, leads to an increased proliferation of T cells. However, the mechanisms underlying T cell activation by sCD137 are yet unclear.

Since elevated sCD137 levels were detected in serum of patients with rheumatoid arthritis and multiple sclerosis, it was assumed that elevated levels also occur in patients with other autoimmune diseases. Higher quantities of sCD137 could be detected in inflammatory regions of psoriasis, ulcerative colitis and Crohn's disease patients compared to healthy regions. Therefore, according patient sera were examined for their amount of sCD137. However, no difference was observed compared to the control group, which is presumably due to the medication of the patients.

In summary, these results could confirm the hypothesis that CD137 is released by a metalloprotease. ADAM10 and -17 were identified as the main sheddases of CD137. In addition, CD137, which was released by shedding, is able to increase T-cell proliferation. These findings can provide a better understanding of the regulatory process of sCD137 and thus provide new ideas for therapeutic strategies for autoimmune diseases that are associated with increased sCD137 levels.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Aderka, D., Engelmann, H., Maor, Y., Brakebusch, C., & Wallach, D. (1992). Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. *Journal of Experimental Medicine*, 175(2), 323–329. <https://doi.org/10.1084/jem.175.2.323>
- Ai, W., Li, H., Song, N., Li, L., & Chen, H. (2013). Optimal method to stimulate cytokine production and its use in immunotoxicity assessment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(9), 3834–3842. <https://doi.org/10.3390/ijerph10093834>
- Akiba, H., Nakano, H., Nishinaka, S., Shindo, M., Kobata, T., Atsuta, M., Morimoto, C., Ware, C. F., Malinin, N. L., Wallach, D., Yagital, H., & Okumura, K. (1998). CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF- κ B and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF- κ B-inducing kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(21), 13353–13358. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.13353>
- Alderson MR, Smith CA, Tough TW, Davis-Smith T, Armitage RJ, Falk B, Roux E, Baker E, Sutherland GR, D. (1994). *Molecular and biological characterization of human 4-1BB and its ligand*. *Eur J Immunol* 24:2219–2227. 2219–2227.
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., Dubose, R. F., Cosman, D., & Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175–179.
- Anderson, D. R., Poterucha, J. T., Mikuls, T. R., Duryee, M. J., Garvin, R. P., Klassen, L. W., Shurmer, S. W., & Thiele, G. M. (2013). IL-6 and its receptors in coronary artery disease and acute myocardial infarction. *Cytokine*, 62(3), 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2013.03.020>
- Ansieau, S., Scheffrahn, I., Mosialos, G., Brand, H., Duyster, J., Kaye, K., Harada, J., Dougall, B., Hübinger, G., Kieff, E., Herrmann, F., Leutz, A., & Gruss, H. J. (1996). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)-1, TRAF-2, and TRAF-3 interact in vivo with the CD30 cytoplasmic domain; TRAF-2 mediates CD30-induced nuclear factor kappa B activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(24), 14053–14058. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.14053>
- Arch, R. H., & Thompson, C. B. (1998). 4-1BB and Ox40 Are Members of a Tumor Necrosis Factor (TNF)-Nerve Growth Factor Receptor Subfamily That Bind TNF Receptor-Associated Factors and Activate Nuclear Factor κ B. *Molecular and Cellular Biology*, 18(1), 558–565. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.1.558>
- Armitage, R. J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Current Opinion in Immunology*, 6(3), 407–413. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0952-7915(94)90119-8)
- Arribas, J., Coodly, L., Vollmer, P., Kishimoto, T. K., Rose-John, S., & Massaguè, J. (1996). Diverse cell surface protein ectodomains are shed by a system sensitive to metalloprotease inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 271(19), 11376–11382. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11376>

- Arribas, J., & Esselens, C. (2009). ADAM17 as a Therapeutic Target in Multiple Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 15(20), 2319–2335. <https://doi.org/10.2174/138161209788682398>
- Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: Signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Bell, J. H., Herrera, A. H., Li, Y., & Walcheck, B. (2007). Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF- and its receptors by neutrophils and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(1), 173–176. <https://doi.org/10.1189/jlb.0307193>
- Binding, O. F. L., Factor, T. N., Soluble, B. Y., & Of, F. (1992). *Inhibition of Ligand Binding and Antiproliferative Effects of Tumor Necrosis Factor and Lyphotoxin by Soluble Forms of Recombinant P60 and P80 Receptors*. 182(2), 638–643.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases from cells. *Nature*, 385(February), 729–733.
- Blazar, B. R., Kwon, B. S., Panoskaltsis-Mortari, A., Kwak, K. B., Peschon, J. J., & Taylor, P. A. (2001). Ligation of 4-1BB (CD137) Regulates Graft-Versus-Host Disease, Graft-Versus-Leukemia, and Graft Rejection in Allogeneic Bone Marrow Transplant Recipients. *The Journal of Immunology*, 166(5), 3174–3183. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.5.3174>
- Bleibaum, F., Sommer, A., Veit, M., Rabe, B., Andrä, J., Kunzelmann, K., Nehls, C., Correa, W., Gutsmann, T., Grötzing, J., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2019). ADAM10 sheddase activation is controlled by cell membrane asymmetry. *Journal of Molecular Cell Biology*, 11(11), 979–993. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz008>
- Blobel, C. P. (2005). ADAMs: Key components in egfr signalling and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(1), 32–43. <https://doi.org/10.1038/nrm1548>
- Bode, W., Gomis-Rüth, F. X., & Stöckler, W. (1993). Astacins, serralsins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the “metzincins.” *FEBS Letters*, 331(1–2), 134–140. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80312-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80312-I)
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., & Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1-and TNF receptor-induced cell death. *Cell*, 85(6), 803–815. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81265-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81265-9)
- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W., & Sheu, S. S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: A mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 287(4 56-4). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00139.2004>
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A., & Israël, A. (2000). A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: The role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular Cell*, 5(2), 207–216. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80417-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80417-7)

- Cartier, A., Côté, M., Bergeron, J., Alméras, N., Tremblay, A., Lemieux, I., & Després, J. P. (2010). Plasma soluble tumour necrosis factor- α receptor 2 is elevated in obesity: Specific contribution of visceral adiposity. *Clinical Endocrinology*, 72(3), 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2009.03671.x>
- Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., & Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *Journal of Immunology*, 154(6), 2706–2713. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7533181>
- Cavadas, M., Oikonomidi, I., Gaspar, C. J., Burbridge, E., Badenes, M., Félix, I., Bolado, A., Hu, T., Bileck, A., Gerner, C., Domingos, P. M., von Kriegsheim, A., & Adrain, C. (2017). Phosphorylation of iRhom2 Controls Stimulated Proteolytic Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE. *Cell Reports*, 21(3), 745–757. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.074>
- Cesaro, A., Abakar-Mahamat, A., Brest, P., Lassalle, S., Selva, E., Filippi, J., Hébuterne, X., Hugot, J. P., Doglio, A., Galland, F., Naquet, P., Vouret-Craviari, V., Mograbi, B., & Hofman, P. M. (2009). Differential expression and regulation of ADAM17 and TIMP3 in acute inflamed intestinal epithelia. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 296(6), 1332–1343. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.90641.2008>
- Chan, F. K. M., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., & Lenardo, M. J. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 288(5475), 2351–2354. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2351>
- Chester, C., Sanmamed, M. F., Wang, J., & Melero, I. (2018). Immunotherapy targeting 4-1BB: Mechanistic rationale, clinical results, and future strategies. *Blood*, 131(1), 49–57. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741041>
- Cheuk, S., Wikén, M., Blomqvist, L., Nylén, S., Talme, T., Ståhle, M., & Eidsmo, L. (2014). Epidermal Th22 and Tc17 Cells Form a Localized Disease Memory in Clinically Healed Psoriasis. *The Journal of Immunology*, 192(7), 3111–3120. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302313>
- Choi, J. W., & Kim, S. K. (2005). Relationships of soluble APO-1 (Fas/CD95) concentrations, obesity, and serum lipid parameters in healthy adults. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 35(3), 290–296.
- Contin, C., Pitard, V., Itai, T., Nagata, S., Moreau, J. F., & Déchanet-Merville, J. (2003). Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor- α -converting enzyme: Implications for CD40 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 32801–32809. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209993200>
- Crawford, H., Dempsey, P., Brown, G., Adam, L., & Moss, M. (2009). ADAM10 as a Therapeutic Target for Cancer and Inflammation. *Current Pharmaceutical Design*, 15(20), 2288–2299. <https://doi.org/10.2174/138161209788682442>
- Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of Immunological Methods*, 160(1), 81–88. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90011-U](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90011-U)
- Darnay, B. G., Haridas, V., Ni, J., Moore, P. A., & Aggarwal, B. B. (1998). Characterization of the intracellular domain of receptor activator of NF- κ B (RANK): Interaction with tumor

- necrosis factor receptor-associated factors and activation of NF- κ B and c-JUN N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), 20551–20555. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.32.20551>
- DeBenedette, M. A., Randall Chu, N., Pollok, K. E., Hurtado, J., Wade, W. F., Kwon, B. S., & Watts, T. H. (1995). Role of 4-1BB ligand in costimulation of T lymphocyte growth and its upregulation on M12 B lymphomas by camp. *Journal of Experimental Medicine*, 181(3), 985–992. <https://doi.org/10.1084/jem.181.3.985>
- Dehnavi, P. R., Eftekhari, S. M., Kadkhodaei, A., & Kefayat, A. (2021). CD137 : A Member of the TNFR Family - in Psoriasis Skin Lesions in Comparison with Normal Skin Specimens. *Iran J Pathol.*, 16(2), 103–108.
- Denholm, E. M., & Stankus, G. P. (1995). Changes in the expression of mcp-1 receptors on monocytic thp-1 cells following differentiation to macrophages with phorbol myristate acetate. *Cytokine*, 7(5), 436–440. <https://doi.org/10.1006/cyto.1995.0059>
- Dev, G., Ebner, R., Chen, R., Lawler, S., Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., & Mountz, J. D. (1994). Protection from Fas-Mediated Apoptosis by a Soluble FOrM of the Fas Molecule. *Scientific Reports*, 263(March), 6–10.
- Devos, R., Guisez, Y., Cornelis, S., Verhee, A., Van der Heyden, J., Manneberg, M., Lahm, H. W., Fiers, W., Tavernier, J., & Plaetinck, G. (1993). Recombinant soluble human interleukin-5 (hIL-5) receptor molecules. Cross- linking and stoichiometry of binding to IL-5. *Journal of Biological Chemistry*, 268(9), 6581–6587. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53290-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53290-7)
- Dharmadhikari, B., Wu, M., Abdullah, N. S., Rajendran, S., Ishak, N. D., Nickles, E., Harfuddin, Z., & Schwarz, H. (2016). CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses. *Oncolimmunology*, 5(4), 1–8. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1113367>
- Dimberg, J., Hugander, A., & Wågšäter, D. (2006). Expression of CD137 and CD137 ligand in colorectal cancer patients. *Oncology Reports*, 15(5), 1197–1200. <https://doi.org/10.3892/or.15.5.1197>
- Drenkard, D., Becke, F. M., Langstein, J., Spruss, T., Kunz-Schughart, L. A., Tan, T. E., Lim, Y. C., & Schwarz, H. (2007). CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. *The FASEB Journal*, 21(2), 456–463. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4739com>
- Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., & Ludwig, A. (2012). The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *European Journal of Cell Biology*, 91(6–7), 472–485. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.003>
- Düsterhöft, S., Michalek, M., Kordowski, F., Oldefest, M., Sommer, A., Röseler, J., Reiss, K., Grötzinger, J., & Lorenzen, I. (2015). Extracellular Juxtamembrane Segment of ADAM17 Interacts with Membranes and Is Essential for Its Shedding Activity. *Biochemistry*, 54(38), 5791–5801. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00497>
- Ebata, T., Mogi, S., Hata, Y., Fujimoto, J. I., Yagita, H., Okumura, K., & Azuma, M. (2001). Rapid induction of CD95 ligand and CD4+ T cell-mediated apoptosis by CD137 (4-1BB) costimulation. *European Journal of Immunology*, 31(5), 1410–1416.

- [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1410::AID-IMMU1410>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1410::AID-IMMU1410>3.0.CO;2-H)
- Ebsen, H., Schröder, A., Kabelitz, D., & Janssen, O. (2013). Differential Surface Expression of ADAM10 and ADAM17 on Human T Lymphocytes and Tumor Cells. *PLoS ONE*, 8(10), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076853>
- Edwards, D. R., Handsley, M. M., & Pennington, C. J. (2009). The ADAM metalloproteinases. *Molecular Aspects of Medicine*, 29(5), 258–289. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>
- Eissner, G., Kolch, W., & Scheurich, P. (2004). Ligands working as receptors: Reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(5), 353–366. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.03.011>
- Espinoza, I., Pochampally, R., Xing, F., Watabe, K., & Miele, L. (2013). Notch signaling: Targeting cancer stem cells and epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1249–1259. <https://doi.org/10.2147/OTT.S36162>
- Ettehadi, P., Greaves, M. W., Wallach, D., Aderka, D., & Camp, R. D. R. (1994). Elevated tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) biological activity in psoriatic skin lesions. *Clinical and Experimental Immunology*, 96(1), 146–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1994.tb06244.x>
- Eun, S.-Y., Lee, S.-W., Xu, Y., & Croft, M. (2015). 4-1BB Ligand Signaling to T Cells Limits T Cell Activation. *The Journal of Immunology*, 194(1), 134–141. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401383>
- Faber, T. W., Pullen, N. A., Fernando, J. F. A., Kolawole, E. M., McLeod, J. J. A., Taruselli, M., Williams, K. L., Rivera, K. O., Barnstein, B. O., Conrad, D. H., & Ryan, J. J. (2014). ADAM10 is required for SCF-induced mast cell migration. *Cellular Immunology*, 290(1), 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.05.005>
- Foell, J. L., Diez-Mendiondo, B. I., Diez, O. H., Holzer, U., Ruck, P., Bapat, A. S., Hoffmann, M. K., Mittler, R. S., & Dannecker, G. E. (2004). Engagement of the CD137 (4-1BB) costimulatory molecule inhibits and reverses the autoimmune process in collagen-induced arthritis and establishes lasting disease resistance. *Immunology*, 113(1), 89–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01952.x>
- Force, W. R., Glass, A. A., Benedict, C. A., Cheung, T. C., Lama, J., & Ware, C. F. (2000). Discrete signaling regions in the lymphotoxin- β receptor for tumor necrosis factor receptor-associated factor binding, subcellular localization, and activation of cell death and NF- κ B pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275(15), 11121–11129. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.15.11121>
- Frauwirth, K. A., & Thompson, C. B. (2002). Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation. *Journal of Clinical Investigation*, 109(3), 295–299. <https://doi.org/10.1172/JCI0214941>
- Furtner, M., Straub, R. H., Krüger, S., & Schwarz, H. (2005). Levels of soluble CD137 are enhanced in sera of leukemia and lymphoma patients and are strongly associated with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 19(5), 883–885. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403675>

- Galibert, L., Tometsko, M. E., Andersen, D. M., Cosman, D., & Dougall, W. C. (1998). The involvement of multiple tumor necrosis factor receptor (TNFR)- associated factors in the signaling mechanisms of receptor activator of NF- κ B, a member of the TNFR superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 273(51), 34120–34127. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.51.34120>
- Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Metzgar, R., Aulakh, G., Ting, R., Ruscetti, F., & Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713–733. <https://doi.org/10.1182/blood.v54.3.713.713>
- Garbers, C., Jänner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S., & Scheller, J. (2011). Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), 14804–14811. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.229393>
- Garni-Wagner, B. A., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Wilde, C., Kang, C. Y., & Kwon, B. S. (1996). 4-1BB Is Expressed on CD45RA^{hi} RO^{hi} Transitional T Cell in Humans. *Cellular Immunology*, 169(1), 91–98. <https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0095>
- Gedrich, R. W., Gilfillan, M. C., Duckett, C. S., Van Dongen, J. L., & Thompson, C. B. (1996). CD30 contains two binding sites with different specificities for members of the tumor necrosis factor receptor-associated factor family of signal transducing proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), 12852–12858. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.22.12852>
- Giancotti, F. G. (2013). XMechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. In *Cell* (Vol. 155, Issue 4, p. 750). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.029>
- Giebler, N., & Zigrino, P. (2016). A disintegrin and metalloprotease (ADAM): Historical overview of their functions. *Toxins*, 8(4), 122. <https://doi.org/10.3390/toxins8040122>
- Goodwin, R. G., Din, W. S., Davis-Smith, T., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Farrah, T., Armitage, R. J., Fanslow, W. C., & Smith, C. A. (1993). Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: a member of an emerging family of cytokines with homology to tumor necrosis factor. *European Journal of Immunology*, 23(10), 2631–2641. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231037>
- Gravestien, L. A., Amsen, D., Boes, M., Calvo, C. R., Kruisbeek, A. M., & Borst, J. (1998). The TNF receptor family member CD27 signals to Jun N-terminal kinase via Traf-2. *European Journal of Immunology*, 28(7), 2208–2216. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199807\)28:07<2208::AID-IMMU2208>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199807)28:07<2208::AID-IMMU2208>3.0.CO;2-L)
- Grimmig, T., Gasser, M., Moench, R., Zhu, L. J., Nawalaniec, K., Callies, S., Wagner, M., Polat, B., Mothi, S. S., Luo, Y., Ribas, C. M., Malafaia, O., Hsiao, L. L., & Waaga-Gasser, A. M. (2019). Expression of Tumor-mediated CD137 ligand in human colon cancer indicates dual signaling effects. *Oncot Immunology*, 8(12), <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1651622>
- Groot, A. J., & Vooijs, M. A. (2012). The role of adams in notch signaling. *Advances in*

- Experimental Medicine and Biology*, 727, 15–36. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0899-4_2
- Grubb, S., Poulsen, K. A., Juul, C. A., Kyed, T., Klausen, T. K., Larsen, E. H., & Hoffmann, E. K. (2013). TMEM16F (Anoctamin 6), an anion channel of delayed Ca²⁺ activation. *Journal of General Physiology*, 141(5), 585–600. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210861>
- Gruss, H. J., & Dower, S. K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: Involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*, 85(12), 3378–3404. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.12.3378.bloodjournal85123378>
- Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, A., Pitti, R. M., Mark, M., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, P., Brush, J., Heldens, S., Schow, P., Goddard, A. D., Wood, W. I., Baker, K. P., Godowski, P. J., & Ashkenazi, A. (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Current Biology*, 9(4), 215–218. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80093-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80093-1)
- Haga, T., Suzuki, J. ichi, Kosuge, H., Ogawa, M., Saiki, H., Haraguchi, G., Maejima, Y., Isobe, M., & Uede, T. (2009). Attenuation of experimental autoimmune myocarditis by blocking T cell activation through 4-1BB pathway. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46(5), 719–727. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.02.003>
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia - A key regulatory factor in tumour growth. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 38–47. <https://doi.org/10.1038/nrc704>
- Hartmann, D., De Strooper, B., Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Illert, A. L., Von Figura, K., & Saftig, P. (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for α -secretase activity in fibroblasts. *Human Molecular Genetics*, 11(21), 2615–2624. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.21.2615>
- Hatzoglou, A., Roussel, J., Bourgeade, M.-F., Rogier, E., Madry, C., Inoue, J., Devergne, O., & Tsapis, A. (2000). TNF Receptor Family Member BCMA (B Cell Maturation) Associates with TNF Receptor-Associated Factor (TRAF) 1, TRAF2, and TRAF3 and Activates NF- κ B, Elk-1, c-Jun N-Terminal Kinase, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Immunology*, 165(3), 1322–1330. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.3.1322>
- Hehlhans, T., & Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: Players, rules and the games. *Immunology*, 115(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x>
- Heller, R. A., Song, K., Onasch, M. A., Fischer, W. H., Chang, D., & Ringold, G. M. (1990). Complementary DNA cloning of a receptor for tumor necrosis factor and demonstration of a shed form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6151–6155. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.16.6151>
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149–1157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90411-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90411-7)
- Hirano, T. (1998). Interleukin 6 and its receptor: Ten years later. In *International Reviews of Immunology*, 16, 3–4, <https://doi.org/10.3109/08830189809042997>

- Horiuchi, K., Le Gall, S., Schulte, M., Yamaguchi, T., Reiss, K., Murphy, G., Toyama, Y., Hartmann, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2007). Substrate selectivity of epidermal growth factor-receptor ligand sheddases and their regulation by phorbol esters and calcium influx. *Molecular Biology of the Cell*, 18(1), 176–188. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-01-0014>
- Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., & Boyle, W. J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *Journal of Biological Chemistry*, 272(21), 13471–13474. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.21.13471>
- Huang, J., Jochems, C., Anderson, A. M., Talaie, T., Jales, A., Madan, R. A., Hodge, J. W., Tsang, K. Y., Liewehr, D. J., Steinberg, S. M., Gulley, J. L., & Schlom, J. (2013). Soluble CD27-Pool in Humans May Contribute to T Cell Activation and Tumor Immunity. *The Journal of Immunology*, 190(12), 6250–6258. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300022>
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K. J., Rose-John, S., & Ludwig, A. (2003). The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood*, 102(4), 1186–1195. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3775>
- Huovila, A. P. J., Turner, A. J., Pelto-Huikko, M., Kärkkäinen, I., & Ortiz, R. M. (2005). Shedding light on ADAM metalloproteinases. *Trends in Biochemical Sciences*, 30(7), 413–422. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.05.006>
- Hurtado, J. C., Kim, S. H., Pollok, K. E., Lee, Z. H., & Kwon, B. S. (1995). Potential role of 4-1BB in T cell activation: Comparison with the costimulatory molecule CD28. *The Journal of Immunology*, 155(7), 3360–3367.
- Huxley-Jones, J., Clarke, T. K., Beck, C., Toubaris, G., Robertson, D. L., & Boot-Handford, R. P. (2007). The evolution of the vertebrate metzincins; Insights from *Ciona intestinalis* and *Danio rerio*. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 1–20. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-63>
- Ishizaka, A., Tono-oka, T., & Matsumoto, S. (1984). The evaluation of proliferative response of lymphocytes by the measurement of intracellular ATP content. *Japanese Journal of Clinical Immunology*, 7(2), 107–110. <https://doi.org/10.2177/jsci.7.107>
- Itoh, A., Ortiz, L., Kachapati, K., Wu, Y., Adams, D., Bednar, K., Mukherjee, S., Chougnet, C., Mittler, R. S., Chen, Y. G., Dolan, L., & Ridgway, W. M. (2019). Soluble CD137 Ameliorates Acute Type 1 Diabetes by Inducing T Cell Anergy. *Frontiers in Immunology*, 10(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02566>
- Janes, P. W., Saha, N., Barton, W. A., Kolev, M. V., Wimmer-Kleikamp, S. H., Nievergall, E., Blobel, C. P., Himanen, J. P., Lackmann, M., & Nikolov, D. B. (2005). Adam meets Eph: An ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell*, 123(2), 291–304. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.014>
- Jang, I. K., Lee, Z. H., Kim, Y. J., Kim, S. H., & Kwon, B. S. (1998). Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor- κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 242(3), 613–620. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.8016>
- Juanes, P. P., Ferreira, L., Montero, J. C., Arribas, J., & Pandiella, A. (2005). N-terminal cleavage

- of proTGF α occurs at the cell surface by a TACE-independent activity. *Biochemical Journal*, 389(1), 161–172. <https://doi.org/10.1042/BJ20041128>
- Kawaguchi, M., Mitsuhashi, Y., & Kondo, S. (2005). Overexpression of tumour necrosis factor- α -converting enzyme in psoriasis. *British Journal of Dermatology*, 152(5), 915–919. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06440.x>
- Kawamata, S., Hori, T., Imura, A., Takaori-Kondo, A., & Uchiyama, T. (1998). Activation of OX40 signal transduction pathways leads to tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 2- and TRAF5-mediated NF κ B activation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5808–5814. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5808>
- Kay, J. E. (1991). Mechanisms of T lymphocyte activation. *Immunology Letters*, 29(1–2), 51–54. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(91\)90198-J](https://doi.org/10.1016/0165-2478(91)90198-J)
- Kienzle, G., & Von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *International Immunology*, 12(1), 73–82. <https://doi.org/10.1093/intimm/12.1.73>
- Kishimoto, T., Goyert, S., Kikutani, H., Mason, D., Miyasaka, M., Moretta, L., Ohno, T., Okumura, K., Shaw, S., Springer, T. A., Sugamura, K., Sugawara, H., von dem Borne, A. E., & Zola, H. (1997). Update of CD antigens, 1996. *Journal of Immunology*, 158(7), 3035–3036. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9120254>
- Kobayashi, T., Beuchat, M. H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J. M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, T., & Gruenberg, J. (2002). Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35), 32157–32164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202838200>
- Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Senba, E., & Kitamura, T. (2000). TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20742–20747. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002691200>
- Krebs, L. T., Xue, Y., Norton, C. R., Shutter, J. R., Maguire, M., Sundberg, J. P., Gallahan, D., Closson, V., Kitajewski, J., Callahan, R., Smith, G. H., Stark, K. L., & Gridley, T. (2000). Notch signaling is essential for vascular morphogenesis in mice. *Genes and Development*, 14(11), 1343–1352. <https://doi.org/10.1101/gad.14.11.1343>
- Kuhne, M. R., Robbins, M., Hambor, J. E., Mackey, M. F., Kosaka, Y., Nishimura, T., Gigley, J. P., Noelle, R. J., & Calderhead, D. M. (1997). Assembly and regulation of the CD40 receptor complex in human B cells. *Journal of Experimental Medicine*, 186(2), 337–342. <https://doi.org/10.1084/jem.186.2.337>
- Kwon, B. S., Kozak, C. A., Kim, K. K., & Pickard, R. T. (1994). Genomic organization and chromosomal localization of the T-cell antigen 4- 1BB. *Journal of Immunology*, 152(5), 2256–2262.
- Kwon, B. S., & Weissman, S. M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(6), 1963–1967. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.6.1963>

- Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., & Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *Journal of Biological Chemistry*, 274(10), 6056–6061. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.10.6056>
- Labiano, S., Palazón, A., Bolaños, E., Azpilikueta, A., Sánchez-Paulete, A. R., Morales-Kastresana, A., Quetglas, J. I., Perez-Gracia, J. L., Gúrpide, A., Rodríguez-Ruiz, M., Aznar, M. A., Jure-Kunkel, M., Berraondo, P., & Melero, I. (2016). Hypoxia-induced soluble CD137 in malignant cells blocks CD137L-costimulation as an immune escape mechanism. *Oncot Immunology*, 5(1), e1062967. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2015.1062967>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lafuente, M. J., Martin, P., Garcia-Cao, I., Diaz-Meco, M. T., Serrano, M., & Moscat, J. (2003). Regulation of mature T lymphocyte proliferation and differentiation by Par-4. *EMBO Journal*, 22(18), 4689–4698. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg460>
- Langstein, J., Michel, J., Fritsche, J., Kreutz, M., Andreesen, R., & Schwarz, H. (1998). CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling. *The Journal of Immunology*, 160(5), 2488–2494.
- Langstein, J., Michel, J., & Schwarz, H. (1999). CD137 induces proliferation and endomitosis in monocytes. *Blood*, 94(9), 3161–3168. <https://doi.org/10.1182/blood.v94.9.3161>
- Laurent, S. A., Hoffmann, F. S., Kuhn, P. H., Cheng, Q., Chu, Y., Schmidt-Suppran, M., Hauck, S. M., Schuh, E., Krumbholz, M., Rübsamen, H., Wanngren, J., Khademi, M., Olsson, T., Alexander, T., Hiepe, F., Pfister, H. W., Weber, F., Jenne, D., Wekerle, H., ... Meinl, E. (2015). γ -secretase directly sheds the survival receptor BCMA from plasma cells. *Nature Communications*, 6, <https://doi.org/10.1038/ncomms8333>
- Le Gall, S. M., Bobé, P., Reiss, K., Horiuchi, K., Niu, X.-D., Lundell, D., Gibb, D. R., Conrad, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2009). ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor α , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 1785–1794. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Le Gall, S. M., Maretzky, T., Issuree, P. D. A., Niu, X. Da, Reiss, K., Saftig, P., Khokha, R., Lundell, D., & Blobel, C. P. (2010). ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *Journal of Cell Science*, 123(22), 3913–3922. <https://doi.org/10.1242/jcs.069997>
- Lee, S. B., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M. S., Keller, S., Altevogt, P., Oh, S. T., Reichrath, J., Oxmann, D., Pfeilschifter, J., Mihic-Probst, D., & Gutwein, P. (2010). ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(3), 763–773. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.335>
- Lens, S. M. A., Drillenburger, P., Den Drijver, B. F. A., Van Schijndel, G., Pals, S. T., Van Lier, R. A. W., & Van Oers, M. H. J. (1999). Aberrant expression and reverse signalling of CD70 on malignant B cells. *British Journal of Haematology*, 106(2), 491–503. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01573.x>

- Lens, S. M. A., Tesselaar, K., Van Oers, M. H. J., & Van Lier, R. A. W. (1998). Control of lymphocyte function through CD27-CD70 interactions. *Seminars in Immunology*, 10(6), 491–499. <https://doi.org/10.1006/smim.1998.0154>
- Locksley, R. M., Killeen, N., & Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*, 104(4), 487–501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Lorenzen, I., Lokau, J., Düsterhöft, S., Trad, A., Garbers, C., Scheller, J., Rose-John, S., & Grötzinger, J. (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Letters*, 586(8), 1093–1100. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.03.012>
- Lotz, M., Setareh, M., Von Kempis, J., & Schwarz, H. (1996). The nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family. *Journal of Leukocyte Biology*, 60(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/jlb.60.1.1>
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M., Broadway, N., Andrews, R., Bickett, D., Leesnitzer, M., & Becherer, J. (2005). Metalloproteinase Inhibitors for the Disintegrin-Like Metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that Differentially Block Constitutive and Phorbol Ester-Inducible Shedding of Cell Surface Molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 8(2), 161–171. <https://doi.org/10.2174/1386207053258488>
- Luu, K., Shao, Z., & Schwarz, H. (2020). The relevance of soluble CD137 in the regulation of immune responses and for immunotherapeutic intervention. *Journal of Leukocyte Biology*, 107(5), 731–738. <https://doi.org/10.1002/JLB.2MR1119-224R>
- M.L., A., K.A., F., & C.B., T. (2001). T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature Reviews. Immunology*, 1(3), 220–228. <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L35640872>
- Maerten, P., Kwon, B. S., Shen, C., De Hertogh, G., Cadot, P., Bullens, D. M. A., Overbergh, L., Mathieu, C., Van Assche, G., Geboes, K., Rutgeerts, P., & Ceuppens, J. L. (2006). Involvement of 4-1BB (CD137)-4-1BB ligand interaction in the modulation of CD4+ T cell-mediated inflammatory colitis. *Clinical and Experimental Immunology*, 143(2), 228–236. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02991.x>
- Maheshwari, G., Steven Wiley, H., & Lauffenburger, D. A. (2001). Autocrine epidermal growth factor signaling stimulates directionally persistent mammary epithelial cell migration. *Journal of Cell Biology*, 155(7), 1123–1128. <https://doi.org/10.1083/jcb.200109060>
- Mallett, S., & Barclay, A. N. (1991). A new superfamily of cell surface proteins related to the nerve growth factor receptor. *Immunology Today*, 12(7), 220–223. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90033-P](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90033-P)
- Maretzky, T., Evers, A., Gall, S. Le, Alabi, R. O., Speck, N., Reiss, K., & Blobel, C. P. (2015). The cytoplasmic domain of a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) regulates its constitutive activity but is dispensable for stimulated ADAM10-dependent shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7416–7425. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.603753>

- Maretzky, T., Reiss, K., Ludwig, A., Buchholz, J., Scholz, F., Proksch, E., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and β -catenin translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9182–9187. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500918102>
- Maretzky, T., Schulte, M., Ludwig, A., Rose-John, S., Blobel, C., Hartmann, D., Altevogt, P., Saftig, P., & Reiss, K. (2005). L1 Is Sequentially Processed by Two Differently Activated Metalloproteases and Presenilin/ γ -Secretase and Regulates Neural Cell Adhesion, Cell Migration, and Neurite Outgrowth. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9040–9053. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.20.9040-9053.2005>
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M., & Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF- κ B and AP-1. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 14029–14032. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.22.14029>
- Massague, J., & Pandiella, A. (1993). *Membrane-anchored growth factors 1*.
- McInnes, I. B., & Schett, G. (2011). The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), 2205–2219. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1004965>
- Mead, J. E., & Fausto, N. (1989). Transforming growth factor α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(5), 1558–1562. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.5.1558>
- Melero, I., Murillo, O., Dubrot, J., Hervás-Stubbs, S., & Perez-Gracia, J. L. (2008). Multi-layered action mechanisms of CD137 (4-1BB)-targeted immunotherapies. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(8), 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.05.005>
- Michel, J., Langstein, J., Hofstädter, F., & Schwarz, H. (1998). A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 28(1), 290–295. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199801\)28:01<290::AID-IMMU290>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199801)28:01<290::AID-IMMU290>3.0.CO;2-S)
- Michel, J., & Schwarz, H. (2000). Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes. *Cytokine*, 12(6), 742–746. <https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0623>
- Moh, M. C., Lorenzini, P. A., Gullo, C., & Schwarz, H. (2013). Tumor necrosis factor receptor 1 associates with CD137 ligand and mediates its reverse signaling. *FASEB Journal*, 27(8), 2957–2966. <https://doi.org/10.1096/fj.12-225250>
- Möller-Hackbarth, K., Dewitz, C., Schweigert, O., Trad, A., Garbers, C., Rose-John, S., & Scheller, J. (2013). A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34529–34544. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.488478>
- Moss, M. L., Jin, S. L. C., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen,

- F., Warner, J., & Willard, D. (1997). Structural features and biochemical properties of TNF- α converting enzyme (TACE). *Journal of Neuroimmunology*, 72(2), 127–129. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(96\)00180-4](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(96)00180-4)
- Moss, Marcia L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., Palmisano, R., & Zhou, P. (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35712–35721. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703231200>
- Moss, Marcia L., & Lambert, M. H. (2002). Shedding of membrane proteins by ADAM family proteases. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 38, pp. 141–153). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/bse0380141>
- Nakano, H., Oshima, H., Chung, W., Williams-Abbott, L., Ware, C. F., Yagita, H., & Okumura, K. (1996). TRAF5, an activator of NF- κ B and putative signal transducer for the lymphotoxin- β receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 14661–14664. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.25.14661>
- Oh, S. T., Schramme, A., Stark, A., Tilgen, W., Gutwein, P., & Reichrath, J. (2008). Overexpression of ADAM 10 and ADAM 12 in lesional psoriatic skin. *British Journal of Dermatology*, 158(6), 1371–1373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08513.x>
- Ohta, S., Harigai, M., Tanaka, M., Kawaguchi, Y., Sugiura, T., Takagi, K., Fukasawa, C., Hara, M., & Kamatani, N. (2001). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) converting enzyme contributes to production of TNF- α in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*, 28(8), 1756–1763.
- Olofsson, P. S., Söderström, L. Å., Wågsäter, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., Hedin, U., Paulsson-Berne, G., Sirsjö, A., & Hansson, G. K. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(10), 1292–1301. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.699173>
- Papadakis, K. A., & Targan, S. R. (2000). Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. In *Annual Review of Medicine* (Vol. 51, pp. 289–298). <https://doi.org/10.1146/annurev.med.51.1.289>
- Pauly, S., Broll, K., Wittmann, M., Giegerich, G., & Schwarz, H. (2002). CD137 is expressed by follicular dendritic cells and costimulates B lymphocyte activation in germinal centers. *Journal of Leukocyte Biology*, 72(1), 35–42. <https://doi.org/10.1189/jlb.72.1.35>
- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., Boyce, R. W., Nelson, N., Kozlosky, C. J., Wolfson, M. F., Rauch, C. T., Cerretti, D. P., Paxton, R. J., March, C. J., & Black, R. A. (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282(5392), 1281–1284. <https://doi.org/10.1126/science.282.5392.1281>
- Petty, R. D., Sutherland, L. A., Hunter, E. M., & Cree, I. A. (1995). Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 10(1), 29–34. <https://doi.org/10.1002/bio.1170100105>
- Pollok, K. E., Kim, Y. J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K. K., Pickard, R. T., & Kwon, B. S. (1993).

- Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *Journal of Immunology*, 150(3), 771–781. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678621>
- Prenzel, N., Zwick, E., Leserer, M., & Ullrich, A. (2000). Tyrosine kinase signalling in breast cancer. Epidermal growth factor receptor: Convergence point for signal integration and diversification. *Breast Cancer Research*, 2(3), 184–190. <https://doi.org/10.1186/bcr52>
- Prox, J., Willenbrock, M., Weber, S., Lehmann, T., Schmidt-Arras, D., Schwanbeck, R., Saftig, P., & Schwake, M. (2012). Tetraspanin15 regulates cellular trafficking and activity of the ectodomain sheddase ADAM10. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(17), 2919–2932. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0960-2>
- Puente, X. S., Sánchez, L. M., Overall, C. M., & López-Otín, C. (2003). Human and mouse proteases: A comparative genomic approach. *Nature Reviews Genetics*, 4(7), 544–558. <https://doi.org/10.1038/nrg1111>
- Pupovac, A., & Sluyter, R. (2016). Roles of extracellular nucleotides and P2 receptors in ectodomain shedding. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73(22), 4159–4173. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2274-2>
- Rani, K., Rana, R., & Datt, S. (2012). Review on latest overview of proteases. *International Journal of Current Life Sciences, January 2012*, 11–18.
- Rath, P. C., & Aggarwal, B. B. (1999). TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of Clinical Immunology*, 19(6), 350–364. <https://doi.org/10.1023/A:1020546615229>
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J., & Black, R. A. (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14608–14614. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14608>
- Reiss, K., & Bhakdi, S. (2017). The plasma membrane: Penultimate regulator of ADAM sheddase function. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11), 2082–2087. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.06.006>
- Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., De Strooper, B., Hartmann, D., & Saftig, P. (2005). ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and β -catenin nuclear signalling. *EMBO Journal*, 24(4), 742–752. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600548>
- Reiss, K., & Saftig, P. (2009). The “A Disintegrin And Metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(2), 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.11.002>
- Remouchamps, C., Boutaffala, L., Ganef, C., & Dejardin, E. (2011). Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 22(5–6), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.11.007>
- Riethmueller, S., Ehlers, J. C., Lokau, J., Düsterhöft, S., Knittler, K., Dombrowsky, G., Grötzinger, J., Rabe, B., Rose-John, S., & Garbers, C. (2016). Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Scientific Reports*, 6(April), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep25550>
- Roca, C., & Adams, R. H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling.

- Genes and Development*, 21(20), 2511–2524. <https://doi.org/10.1101/gad.1589207>
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: Importance for the proinflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), 1237–1247. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4989>
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., & Goeddel, D. V. (1994). A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 78(4), 681–692. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90532-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90532-0)
- Saftig, P., & Reiss, K. (2011). The “A Disintegrin And Metalloproteases” ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? *European Journal of Cell Biology*, 90(6–7), 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.005>
- Sahin, U., Weskamp, G., Kelly, K., Zhou, H. M., Higashiyama, S., Peschon, J., Hartmann, D., Saftig, P., & Blobel, C. P. (2004). Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *Journal of Cell Biology*, 164(5), 769–779. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307137>
- Salih, H. R., Schmetzer, H. M., Burke, C., Starling, G. C., Dunn, R., Pelka-Fleischer, R., Nuessler, V., & Kiener, P. A. (2001). Soluble CD137 (4-1BB) Ligand Is Released Following Leukocyte Activation and Is Found in Sera of Patients with Hematological Malignancies. *The Journal of Immunology*, 167(7), 4059–4066. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.7.4059>
- Schoenbrunn, A., Frentsch, M., Kohler, S., Keye, J., Doms, H., Moewes, B., Dong, J., Lodenkemper, C., Sieper, J., Wu, P., Romagnani, C., Matzmohr, N., & Thiel, A. (2012). A Converse 4-1BB and CD40 Ligand Expression Pattern Delineates Activated Regulatory T Cells (Treg) and Conventional T Cells Enabling Direct Isolation of Alloantigen-Reactive Natural Foxp3 + Treg . *The Journal of Immunology*, 189(12), 5985–5994. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201090>
- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., Ludwig, A., Blobel Carl, P., Saftig, P., & Reiss, K. (2008). Disintegrin Metalloprotease (ADAM) 10 Regulates Endothelial Permeability and T Cell Transmigration by Proteolysis of Vascular Endothelial Cadherin. *Circulation Research*, 102(10), 1192–1201. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.169805>
- Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., Von Kempis, J., & Lotz, M. (1995). ILA the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood*, 85(4), 1043–1052. <https://doi.org/10.1182/blood.v85.4.1043.bloodjournal8541043>
- Schwarz, Herbert. (2005). Biological activities of reverse signal transduction through CD137 ligand. *Journal of Leukocyte Biology*, 77(3), 281–286. <https://doi.org/10.1189/jlb.0904558>
- Schwarz, Herbert, Arden, K., & Lotz, M. (1997). CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalizes with several malignancies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 235(3), 699–703. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6870>
- Schwarz, Herbert, Blanco, F. J., Von Kempis, J., Valbracht, J., & Lotz, M. (1996). ILA, a member of the human nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor family, regulates T-lymphocyte proliferation and survival. *Blood*, 87(7), 2839–2845. <https://doi.org/10.1182/blood.v87.7.2839.bloodjournal8772839>

- Schwarz, Herbert, Tuckwell, J., & Lotz, M. (1993). A receptor induced by lymphocyte activation (ILA): a new member of the human nerve-growth-factor/tumor-necrosis-factor receptor family. *Gene*, 134(2), 295–298. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90110-O](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90110-O)
- Seipold, L., Damme, M., Prox, J., Rabe, B., Kasperek, P., Sedlacek, R., Altmeppen, H., Willem, M., Boland, B., Glatzel, M., & Saftig, P. (2017). Tetraspanin 3: A central endocytic membrane component regulating the expression of ADAM10, presenilin and the amyloid precursor protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(1), 217–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.003>
- Seo, S. K., Choi, J. H., Kim, Y. H., Kang, W. J., Park, H. Y., Suh, J. H., Choi, B. K., Vinay, D. S., & Kwon, B. S. (2004). 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nature Medicine*, 10(10), 1088–1094. <https://doi.org/10.1038/nm1107>
- Setareh, M., Schwarz, H., & Lotz, M. (1995). A mRNA variant encoding a soluble form of 4-1BB, a member of the murine NGF/TNF receptor family. *Gene*, 164(2), 311–315. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00349-B](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00349-B)
- Shao, Z., & Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *Journal of Leukocyte Biology*, 89(1), 21–29. <https://doi.org/10.1189/jlb.0510315>
- Shao, Z., Sun, F., Koh, D. R., & Schwarz, H. (2008). Characterisation of soluble murine CD137 and its association with systemic lupus. *Molecular Immunology*, 45(15), 3990–3999. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.05.028>
- Sharief, M. K. (2002). Heightened intrathecal release of soluble CD137 in patients with multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*, 9(1), 49–54. <https://doi.org/10.1046/j.1468-1331.2002.00323.x>
- Shuford, W. W., Klussman, K., Tritchler, D. D., Loo, D. T., Chalupny, J., Siadak, A. W., Brown, T. J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, C. P., Pearson, T. C., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., & Mittler, R. S. (1997). 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8+ T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *Journal of Experimental Medicine*, 186(1), 47–55. <https://doi.org/10.1084/jem.186.1.47>
- Singh, A. B., & Harris, R. C. (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cellular Signalling*, 17(10), 1183–1193. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2005.03.026>
- Skoda, R. C., Seldin, D. C., Chiang, M. K., Peichel, C. L., Vogt, T. F., & Leder, P. (1993). Murine c-mpl: A member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily that transduces a proliferative signal. *EMBO Journal*, 12(7), 2645–2653. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05925.x>
- Smith, C. A., Farrah, T., & Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: Activation, costimulation, and death. *Cell*, 76(6), 959–962. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90372-7)
- Smith, T. M., Tharakan, A., & Martin, R. K. (2020). Targeting ADAM10 in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology*, 11(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00499>

- Smulski, C. R., Kury, P., Seidel, L. M., Staiger, H. S., Edinger, A. K., Willen, L., Seidl, M., Hess, H., Salzer, U., Rolink, A. G., Rizzi, M., Schneider, P., & Eibel, H. (2017). BAFF- and TACI-Dependent Processing of BAFFR by ADAM Proteases Regulates the Survival of B Cells. *Cell Reports*, 18(9), 2189–2202. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.005>
- Smyth, M. J., Zachariae, C. C., Norihisa, Y., Ortaldo, J. R., Hishinuma, A., & Matsushimat, A. N. D. K. (1991). IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *Journal of Immunology*, 146(11), 3815–3823.
- Söderström, L., Tarnawski, L., & Olofsson, P. S. (2018). CD137: A checkpoint regulator involved in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 272, 66–72. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2018.03.007>
- Sommer, A., Fries, A., Cornelsen, I., Speck, N., Koch-Nolte, F., Gimpl, G., Andrä, J., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2012). Melittin modulates keratinocyte function through P2 receptor-dependent ADAM activation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(28), 23678–23689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.362756>
- Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., Maretzky, T., Evers, A., Andrä, J., Düsterhöft, S., Michalek, M., Lorenzen, I., Somasundaram, P., Tholey, A., Sönnichsen, F. D., Kunzelmann, K., Heinbockel, L., Nehls, C., Gutschmann, T., Grötzinger, J., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2016). Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>
- Stamenkovic, I., Clark, E. A., & Seed, B. (1989). A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *EMBO Journal*, 8(5), 1403–1410. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03521.x>
- Sun, Y., Lin, X., Chen, H. M., Wu, Q., Subudhi, S. K., Chen, L., & Fu, Y.-X. (2002). Administration of Agonistic Anti-4-1BB Monoclonal Antibody Leads to the Amelioration of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 168(3), 1457–1465. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.3.1457>
- Swindell, W. R., Stuart, P. E., Sarkar, M. K., Voorhees, J. J., Elder, J. T., Johnston, A., & Gudjonsson, J. E. (2014). Cellular dissection of psoriasis for transcriptome analyses and the post-GWAS era. *BMC Medical Genomics*, 7(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-7-27>
- Sykulev, Y., Joo, M., Vturina, I., Tsomides, T. J., & Eisen, H. N. (1996). Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity*, 4(6), 565–571. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80483-5](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80483-5)
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58(3), 573–581. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90438-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90438-8)
- Taraban, V. Y., Rowley, T. F., O'Brien, L., Claude Chan, H. T., Haswell, L. E., Green, M. H. A., Tutt, A. L., Glennie, M. J., & Al-Shamkhani, A. (2002). Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses. *European Journal of Immunology*, 32(12), 3617–3627. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200212\)32:12<3617::AID-IMMU3617>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200212)32:12<3617::AID-IMMU3617>3.0.CO;2-M)

- Thompson, J. S., Bixler, S. A., Qian, F., Vora, K., Scott, M. L., Cachero, T. G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I. D., Mullen, C., Strauch, K., Zafari, M., Benjamin, C. D., Tschopp, J., Browning, J. L., & Ambrose, C. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science*, 293(5537), 2108–2111. <https://doi.org/10.1126/science.1061965>
- Tippmann, F., Hundt, J., Schneider, A., Endres, K., & Fahrenholz, F. (2009). Up-regulation of the α -secretase ADAM10 by retinoic acid receptors and acitretin. *The FASEB Journal*, 23(6), 1643–1654. <https://doi.org/10.1096/fj.08-121392>
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., & Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *International Journal of Cancer*, 26(2), 171–176. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910260208>
- Tu, W. C., Wu, C. C., Hsieh, H. L., Chen, C. Y., & Hsu, S. L. (2008). Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells. *Toxicon*, 52(2), 318–329. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.06.007>
- Van Der Voort, R., Van Lieshout, A. W. T., Toonen, L. W. J., Slöetjes, A. W., Van Den Berg, W. B., Figdor, C. G., Radstake, T. R. D. J., & Adema, G. J. (2005). Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis and Rheumatism*, 52(5), 1381–1391. <https://doi.org/10.1002/art.21004>
- Van Meer, G., & De Kroon, A. I. P. M. (2011). Lipid map of the mammalian cell. *Journal of Cell Science*, 124(1), 5–8. <https://doi.org/10.1242/jcs.071233>
- Van Oers, M. H. J., Pals, S. T., Evers, L. M., Van der Schoot, C. E., Koopman, G., Bonfrer, J. M. G., Hintzen, R. Q., Von dem Borne, A. E. G. K., & Van Lier, R. A. W. (1993). Expression and release of CD27 in human B-cell malignancies. *Blood*, 82(11), 3430–3436. <https://doi.org/10.1182/blood.v82.11.3430.3430>
- Van Zee, K. J., Kohno, T., Fischer, E., Rock, C. S., Moldawer, L. L., & Lowry, S. F. (1992). Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor α in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(11), 4845–4849. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.11.4845>
- Veit, M., Ahrens, B., Seidel, J., Sommer, A., Bhakdi, S., & Reiss, K. (2019). Mutagenesis of the ADAM17-phosphatidylserine-binding motif leads to embryonic lethality in mice. *Life Science Alliance*, 2(5), 1–8. <https://doi.org/10.26508/lsa.201900430>
- Von Kempis, J., Schwarz, H., & Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. *Osteoarthritis and Cartilage*, 5(6), 394–406. [https://doi.org/10.1016/s1063-4584\(97\)80044-1](https://doi.org/10.1016/s1063-4584(97)80044-1)
- von Tresckow, B., Kallen, K.-J., von Strandmann, E. P., Borchmann, P., Lange, H., Engert, A., & Hansen, H. P. (2004). Depletion of Cellular Cholesterol and Lipid Rafts Increases Shedding of CD30. *The Journal of Immunology*, 172(7), 4324–4331. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.7.4324>
- Waldschmidt, T. J., & Noelle, R. J. (2001). Long Live the Mature B Cell - a BAFFling Mystery

- Resolved. *Science*, 293, 2012–2013.
- Wang, Q., Zhang, P., Zhang, Q., Wang, X., Li, J., Ma, C., Sun, W., & Zhang, L. (2008). Analysis of CD137 and CD137L expression in human primary tumor tissues. *Croatian Medical Journal*, 49(2), 192–200. <https://doi.org/10.3325/cmj.2008.2.192>
- Weissmann, G. (2006). The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 64(1–2), 12–15. <https://doi.org/10.1056/nejmra1004965>
- Weskamp, G., Schlöndorff, J., Lum, L., Becherer, J. D., Kim, T. W., Saftig, P., Hartmann, D., Murphy, G., & Blobel, C. P. (2004). Evidence for a Critical Role of the Tumor Necrosis Factor α Convertase (TACE) in Ectodomain Shedding of the p75 Neurotrophin Receptor (p75NTR). *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4241–4249. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307974200>
- Whitfield, S. J. C., Taylor, C., Risdall, J. E., Griffiths, G. D., Jones, J. T. A., Williamson, E. D., Rijpkema, S., Saraiva, L., Vessillier, S., Green, A. C., & Carter, A. J. (2017). Interference of the T Cell and Antigen-Presenting Cell Costimulatory Pathway Using CTLA4-Ig (Abatacept) Prevents Staphylococcal Enterotoxin B Pathology. *The Journal of Immunology*, 198(10), 3989–3998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601525>
- Wiley, S. R., Goodwin, R. G., & Smith, C. A. (1996). Reverse Signaling via CD30 Ligand. *Journal of Immunology*, 157(8), 3635–3639.
- Wilmer, J. L., & Luster, M. I. (1995). Chemical induction of interleukin-8, a proinflammatory chemokine, in human epidermal keratinocyte cultures and its relation to cytogenetic toxicity. *Cell Biology and Toxicology*, 11(1), 37–50. <https://doi.org/10.1007/BF00769991>
- Wong, H. Y., & Schwarz, H. (2020). CD137 / CD137 ligand signalling regulates the immune balance: A potential target for novel immunotherapy of autoimmune diseases. *Journal of Autoimmunity*, 112(May), 102499. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102499>
- Xia, X. Z., Treanor, J., Senaldi, G., Khare, S. D., Boone, T., Kelley, M., Theill, L. E., Colombero, A., Solovyev, I., Lee, F., McCabe, S., Elliott, R., Miner, K., Hawkins, N., Guo, J., Stolina, M., Yu, G., Wang, J., Delaney, J., ... Hsu, H. (2000). TRAF is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(1), 137–143. <https://doi.org/10.1084/jem.192.1.137>
- Yan, J., Wang, C., Chen, R., & Yang, H. (2013). Clinical implications of elevated serum soluble CD137 levels in patients with acute coronary syndrome. *Clinics*, 68(2), 193–198. [https://doi.org/10.6061/clinics/2013\(02\)OA12](https://doi.org/10.6061/clinics/2013(02)OA12)
- Zhou, Z., Kim, S., Hurtado, J., Lee, Z. H., Kim, K. K., Pollok, K. E., & Kwon, B. S. (1995). Characterization of human homologue of 4-1BB and its ligand. *Immunology Letters*, 45(1–2), 67–73. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(94\)00227-I](https://doi.org/10.1016/0165-2478(94)00227-I)
- Zschaler, J., Schlorke, D., & Arnhold, J. (2014). Differences in innate immune response between man and mouse. *Critical Reviews in Immunology*, 34(5), 433–454. <https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.2014011600>
- Zunke, F., & Rose-John, S. (2017). The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(11), 2059–2070. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.07.001>

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: KLASSIFIZIERUNG DER ZINK-METALLOPROTEASEN.	- 1 -
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER DOMÄNENSTRUKTUR ‚TYPISCHER‘ ADAMS UND DER ‚ATYPISCHEN‘ ADAM10 UND -17.	- 3 -
ABBILDUNG 3: AKTIVIERUNG VON ADAM10/17 VERMITTELTEM SHEDDING.	- 5 -
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER HUMANEN CD137-PROTEINSYNTHESE.	- 11 -
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER BIDIREKTIONALEN SIGNALÜBERTRAGUNG DES CD137/CD137-LIGANDEN-SYSTEMS.	- 12 -
ABBILDUNG 6: FRAKTIONIERUNG DES BLUTES DURCH DICHTEGRAIENTENZENTRIFUGATION.	- 25 -
ABBILDUNG 7: FREISETZUNG VON SCD137 WIRD VON ADAM10 UND ADAM17 VERMITTELT.	- 40 -
ABBILDUNG 8: TRANSFEKTIONSKONTROLLE VON HEK293T WT- UND -DKO-ZELLEN.	- 41 -
ABBILDUNG 9: ADAM10 UND -17 SIND FÜR DIE FREISETZUNG VON CD137 IN HEK293T WT VERANTWORTLICH.	- 43 -
ABBILDUNG 10: OBERFLÄCHENEXPRESSION VON CD137 AUF CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN NACH AKTIVIERUNG.	- 45 -
ABBILDUNG 11: SCD137 IN ZELLKULTURÜBERSTÄNDEN VON CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN NACH AKTIVIERUNG.	- 46 -
ABBILDUNG 12: ADAM10 IST DIE HAUPTSHEDDASE VON ENDOGEN EXPRIMIERTEM CD137 IN T-ZELLEN.	- 47 -
ABBILDUNG 13: CD137-OBERFLÄCHENEXPRESSION AUF CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN NACH INKUBATION MIT INHIBITOREN.	- 49 -
ABBILDUNG 14: CD137-LIGANDEN-EXPRESSION IN HL60- UND THP1-ZELLEN.	- 52 -
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER KOKULTIVIERUNG VON AKTIVIERTEN THP1- ODER HL60- ZELLEN MIT CD137-TRANSFIZIERTEN HEK- ZELLEN.	- 52 -
ABBILDUNG 16: IL8-FREISETZUNG VON THP1- BZW. HL60-ZELLEN NACH KOKULTIVIERUNG MIT CD137- TRANSFIZIERTEN HEK-ZELLEN.	- 53 -
ABBILDUNG 17: HYPERAKTIVES ANOCTAMIN-6 (ANO6H) FÜHRT ZUM SHEDDING VON CD137 IN HT29- UND HEK293T-ZELLEN.	- 55 -
ABBILDUNG 18: MRNA-EXPRESSION VON CD137 UND CD137-LIGAND IN CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN.	- 55 -
ABBILDUNG 19: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PROLIFERATIONSASSAY.	- 56 -
ABBILDUNG 20: GESHEDDETES SCD137 ERHÖHT DIE PROLIFERATION IN CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN.	- 57 -
ABBILDUNG 21: SCD137 IN SEREN VON PATIENTEN MIT PSORIASIS, MORBUS CROHN UND COLITIS ULCEROSA.	- 58 -
ABBILDUNG 22: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MÖGLICHEN WIRKMECHANISMEN VON SCD137.	- 67 -

10 TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: AUSGEWÄHLTE SUBSTRATE VON ADAM10 UND ADAM17	- 5 -
TABELLE 2: FUNKTION UND LIGANDEN TRAF-BINDENDER MITGLIEDER DER TNFR-SUPERFAMILIE	- 8 -
TABELLE 3: MATERIALIEN	- 15 -
TABELLE 4: CHEMIKALIEN	- 16 -
TABELLE 5: KITS	- 18 -
TABELLE 6: GERÄTE	- 18 -
TABELLE 7: PRIMÄRE ANTIKÖRPER	- 19 -
TABELLE 8: SEKUNDÄRER ANTIKÖRPER	- 20 -
TABELLE 9: PLASMIDE	- 20 -
TABELLE 10: SOFTWARE	- 20 -
TABELLE 11: PIPETTIERSCHEMA FÜR TRANSFEKTIONSANSÄTZE	- 24 -
TABELLE 12: VERWENDETE INHIBITOREN UND STIMULANZIEN	- 24 -
TABELLE 13: VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	- 33 -
TABELLE 14: PROGRAMM FÜR <i>TOUCHDOWN</i> -PCR	- 34 -
TABELLE 15: VERWENDETES PROGRAMM FÜR DIE <i>REAL-TIME</i> PCR	- 35 -

11 PUBLIKATIONEN

Role of ADAM10 and ADAM17 in Regulating CD137 Function

Seidel J., Leitzke S., Ahrens B., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss, K.

Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 2730. doi:10.3390/ijms22052730

The role of scramblases for the shedding of CD137 in epithelial cells

Leitzke S., **Seidel J.**, Sperrhacke M., Reiss K.

Exp. Dermatol. 2021, 30 (3), e10. <https://doi.org/10.1111/exd.14263>

ADAM10/17 as Regulator of CD137 Function

Seidel J., Reiss K.

Exp. Dermatol. 2021, 30 (3), e10-11. <https://doi.org/10.1111/exd.14263>

Mutagenesis of the ADAM17-phosphatidylserine-binding motif leads to embryonic lethality in mice

Veit M., Ahrens B., **Seidel J.**, Sommer A., Bhakdi S., Reiss K.

Life Sci Alliance 2019 Aug 27;2(5):e201900430. doi: 10.26508/lsa.20190

12 DANKSAGUNG

An allererster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Karina Reiß für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchzuführen, bedanken. Vielen Dank für die Vergabe des interessanten Forschungsthemas, die kontinuierliche, gute Betreuung ohne die ich wohl die für mich bislang größte Herausforderung nicht gemeistert hätte und die stetig aufmunternden Worte, wenn mal wieder etwas nicht so geklappt hat wie man es sich vorgestellt hat.

Weiterhin möchte ich mich rechtherzlich beim RTG1743 bedanken. Dies gab mir die Möglichkeit mich auch außerhalb des Labors wissenschaftlich umzusehen.

Ich hätte viele der Herausforderungen meiner Doktorarbeit wohl nicht ohne die gesamte AG Reiß geschafft, insbesondere der stetige Kaffee- und Naschinachschub und die tausenden Lachanfänge waren eine große Unterstützung. Björni danke ich für die gute Einarbeitung ins Labor, dass du trotz allem den ein oder anderen *Western Blot* für mich übernommen hast und mit deinen Adleraugen immer den Überblick im Labor behältst. Und natürlich für die beste Avocadocreme! Maria, unsre Löwenmama. Zwei Mädels zu Hause und dann noch zwei Mädels im Labor. Was für eine Challenge. Aber egal welche Frage oder welches Problem ich hatte, du hast eine Antwort darauf! Selbst wenn du nichts sagst und mir einfach nur zuhörst. Ich hätte mir keine bessere PostDocin wünschen können. Deinetwegen weiß ich auch endlich, dass ich den Kopf eines Kindes habe! Vielen Dank für alles.

Der größte Dank geht natürlich an Sini. Nichts was ich sagen könnte, würde ausreichen um dir zu sagen, wie dankbar ich dir bin, dass du stets zu mir hältst. Auch mal mit harscher Kritik und Diskussionsfreude, aber trotzdem mit bedingungsloser Unterstützung. Liebs, dass du mein unbezahlter Therapeut bist und immer darauf achtest, dass mein Weinglas voll ist. Danke, dass du meine beste Freundin bist.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie. Besonders Carina Frauenstein und Astrid Seidel, ohne deren stetigen Rückhalt ich weder mein Studium noch meine Doktorandenzeit geschafft hätte. Obwohl ihr immer noch denkt, dass ich im Tümpel Frösche sammle.

13 ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Jana Seidel, dass ich die vorliegende Arbeit – abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine akademischen Betreuer und Betreuerinnen – selbstständig und nur mit den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verfasst habe.

Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG). Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität zur Begutachtung im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Des Weiteren habe ich an keiner anderen Hochschule oder keiner anderen Fakultät dieser Hochschule ein Promotionsvorhaben endgültig nicht bestanden und mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Role of ADAM10 and ADAM17 in Regulating CD137 Function

Seidel J., Leitzke S., Ahrens B., Sperrhacke M., Bhakdi S., Reiss, K.

Int. J. Mol. Sci.2021,22,2730. doi:10.3390/ijms22052730

ADAM10/17 as Regulator of CD137 Function

Seidel J., Reiss K.

Exp. Dermatol. 2021, 30 (3), e10-11. <https://doi.org/10.1111/exd.14263>

Ort, Datum

Jana Seidel

